

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE  
PROTEÍNAS CON INTERÉS FISIOPATOLÓGICO POR  
PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS : ALDO-  
CETO REDUCTASAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRES ENTADA POR**

**Beatriz Díez Dacal**

**Bajo la dirección de las doctoras**

**M<sup>a</sup> Dolores Pérez-Sala Gozalo  
Cristina Casals Carro**

**Madrid, 2013**



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I

**CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS  
CON INTERÉS FISIOPATOLÓGICO POR PROSTAGLANDINAS  
CICLOPENTENONAS: ALDO-CETO REDUCTASAS.**

Memoria presentada por

**Beatriz Díez Dacal**

para optar al Título de Doctor

Dra. M<sup>a</sup> Dolores Pérez-Sala Gozalo

Directora

Dra. Cristina Casals Carro

Tutora

Centro de investigaciones Biológicas, CSIC

Madrid, 2012



## **Agradecimientos**



*La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la financiación del proyecto de la Red de investigación de reacciones adversas a alérgenos y fármacos (RIRAAF) RD07/0064/0007 del Instituto de Salud Carlos III y de los proyectos SAF2006-03489 y SAF2009-11642 del Ministerio de Ciencia e Innovación.*

*En primer lugar quiero darle las gracias a la Dra. Dolores Pérez-Sala, mi directora de Tesis, por haber confiado en mí desde el primer momento, y haberme ofrecido la oportunidad de realizar una Tesis Doctoral en su laboratorio. Gracias por tu paciencia y perseverancia durante estos años, y por enseñarme a hacer ciencia.*

*También quiero agradecer a todas las personas que han compartido conmigo el día a día en el laboratorio durante la realización de esta Tesis, pues este trabajo es también vuestro. En primer lugar a M<sup>a</sup> Jesús, por ayudarme en todo siempre que te lo he pedido, por los buenos ratos que hemos pasados todos estos años, y sobre todo por cuidarme tanto.*

*A Bea G., gracias por tu apoyo y tu ayuda científica siempre que lo he necesitado, por los buenos momentos vividos juntas tanto dentro como fuera del CIB, por las infinitas risas... y principalmente por tu amistad.*

*Gracias a Mónica, porque aquel año, mi primer año en el laboratorio, para mí fue inolvidable. Gracias también a Fran, por su ayuda en los primeros meses.*

*Gracias a mis actuales compañeros del 007, a Clara, por todos estos años compartiendo laboratorio, por los buenos momentos pasados en esos congresos..., y por tu ayuda en estas últimas fases. A Dani, por llenar el laboratorio de buen humor y alegría, y por ayudarme a no volverme loca durante la última etapa de la escritura...*

*A todas las demás personas que habéis estado en el laboratorio durante más o menos tiempo a lo largo de estos casi 5 años, porque de cada uno de vosotros he aprendido algo: gracias a Francesca, Irene, Ruth, Pedro, Edurne, Delia, Carlos, Adri, Javi...y a la nueva incorporación, Julia.*

*También quiero agradecer al personal de los Servicios de Cultivos, Proteómica, Microscopía Confocal, Microscopía Electrónica y Citometría de flujo del CIB, por brindarme su ayuda científica y experimental siempre que lo he necesitado.*

*Por supuesto, no puedo olvidarme de todas las personas que he conocido en el CIB durante la realización de esta Tesis, y con las que he compartido momentos maravillosos e inolvidables. A los que ya se fueron, Zaira, María T, Marta, Virginia, Yoli... y a los que todavía formáis parte de mi día a día en el CIB, María R, Estefanía, Eva, Cris, Leo, Javi, Jorge, Joaquín.... Nunca olvidaré los buenos ratos vividos con todos vosotros durante estos años, la comida en el CIB cada día, las risas, las fiestas, los viajes, los disfraces... gracias a vosotros esta etapa ha sido mucho más fácil, pero sobre todo más divertida.*

*La realización de esta Tesis nunca hubiera sido posible sin el apoyo de mi familia. En primer lugar, mis padres. No hay palabras suficientes para agradecer todo lo que habéis hecho por mí. Gracias por vuestra ayuda y comprensión en todo lo que he hecho en mi vida, por vuestro cariño y por estar ahí siempre que os he necesitado. Gracias por enseñarme a ser como soy. Sin vosotros no hubiera podido llegar hasta aquí. Gracias a mi hermano, de quien he aprendido que con esfuerzo y sacrificio se consigue todo lo que uno se proponga. Gracias también al resto de mi familia, por permanecer siempre tan unidos, en especial a mi abuela, a la que admiro por su fortaleza e inteligencia, y a mis tías, Paqui y M<sup>a</sup> Luz, por cuidarme tanto.*

*También quiero agradecer a mis amigas, porque aunque ajenas a esto de la ciencia, habéis contribuido a construir esta Tesis poco a poco. Gracias a Mónica, Lidia, Clara, Susana y Cristina, por lo que llevamos compartiendo durante tantos años, y por estar ahí siempre, dispuestas a escuchar cuando se os necesita.*

*Gracias también a mis Erasmus, porque me visteis dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, y fuisteis mi primer apoyo lejos de casa, allá en tierras Holandesas.*

*A mis amigos de la Universidad de Alcalá, gracias por seguir cerca a pesar de la distancia y del paso del tiempo.*

*Gracias a Bea S., por ser tan buena compañera de piso y cuidarme tanto, por comprenderme y animarme en los malos momentos, y por lo bien que lo pasamos durante los años que vivimos juntas. Gracias también a Lorena, por esos meses tan agradables en Eugenio Salazar.*

*Finalmente, quiero darle las gracias a Gonzalo. Sin duda, lo mejor que me ha pasado durante la realización de esta Tesis ha sido conocerte. Gracias por darle sentido a todo, por estar a mi lado cada día, por ser tan buen científico y enseñarme tantas cosas, y por tu buen humor y tu sonrisa, aún en los momentos difíciles.*

*Beatriz.*

## Índice





Abreviaturas	1
Resumen	9
Introducción	12
1.- LAS PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS	16
1.1.- Síntesis de las cyPG	16
1.2.- Niveles de cyPG <i>in vivo</i>	16
1.3.- Mecanismos de acción	18
1.4.- Selectividad en la modificación de proteínas por cyPG	20
1.5.- Efectos biológicos	22
2.- Los Isoprostanos	23
3.- LAS PROSTAGLANDINAS DE LA SERIE A	23
3.1.- Efectos antitumorales de las PGAs	24
3.2.- Desarrollo de compuestos derivados de PGAs	26
3.3.- PGAs en quimiorresistencia	27
4.- ABORDAJES PROTEÓMICOS Y DIANAS CELULARES DE LAS PGAs	28
5.- LAS ALDO-CETO REDUCTASAS	31
6.- LA ALDOSA REDUCTASA	32
6.1.- La aldosa reductasa en las complicaciones diabéticas secundarias	33
6.2.- La aldosa reductasa en la respuesta antioxidante	34
6.3.- La aldosa reductasa en patologías inflamatorias	36
6.4.- La aldosa reductasa en otras patologías	37
6.5.- Regulación de la expresión de la aldosa reductasa	39
7.- La AKR1B10	39
7.1.- La AKR1B10 en cáncer	40
7.2.- Inhibición de la AKR1B10 en el tratamiento de tumores	43
7.3.- Regulación de la expresión de la AKR1B10	44
Objetivos	46
Material y Métodos	47
1.- MATERIAL	51
1.1.- Material de cultivos celulares	51

1.2.- Lípidos electrófilos _____	51
1.3.- Anticuerpos _____	51
1.4.- Reactivos de electroforesis _____	51
1.5.- Otros reactivos _____	52
2.- MÉTODOS _____	52
2.1.- Cultivos celulares _____	52
2.2.- Mutagénesis _____	53
2.3.- Transfecciones _____	54
2.4.- Tratamientos de las células en cultivo _____	54
2.5.- Obtención de lisados celulares _____	54
2.6.- Extracción de la fracción celular soluble (S100) _____	55
2.7.- Electroforesis y Western blot _____	55
2.8.- Purificación de proteínas marcadas con PGA <sub>1</sub> -B mediante cromatografía en resina de neutravidina-agarosa _____	56
2.9.- Ensayos de actividad enzimática _____	56
2.10.- Análisis del ciclo y muerte celular _____	57
2.11.- Detección de la acumulación intracelular de doxorubicina _____	57
2.12.- Ensayo de crecimiento celular independiente de adhesión en agarosa _____	58
2.13.- Ensayo de migración celular _____	58
2.14.- Ensayo de viabilidad/proliferación celular _____	58
2.15.- Análisis de la modificación de AKR recombinantes por PGA <sub>1</sub> _____	59
2.16.- Análisis estadístico _____	60
Resultados _____	63
1.- MODIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AKR1B1 Y AKR1B10 POR PGA <sub>1</sub> -B EN CÉLULAS HUMANAS _____	65
2.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B1 POR PGA <sub>1</sub> _____	68
2.1.- Estudio de la modificación de la proteína recombinante humana AKR1B1 por PGA <sub>1</sub> mediante MS _____	68
2.2.- Efecto de la PGA <sub>1</sub> sobre la actividad enzimática de AKR1B1 _____	69
3.- CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE AKR1B1 POR PGA <sub>1</sub> _____	69
4.- CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE PGA <sub>1</sub> -B CON AKR1B1 _____	72

5.- INTERACCIÓN DE OTRAS PG Y COMPUESTOS ANÁLOGOS CON AKR1B1	74
6.- EFECTO DE OTROS INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AKR1B1	77
6.1.- Efecto de NADPH y NADP <sup>+</sup> sobre la actividad enzimática de AKR1B1	78
7.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR PGA <sub>1</sub>	82
7.1.- Estudio de la modificación de la proteína recombinante AKR1B10 por PGA <sub>1</sub>	82
7.2.- Estudio de la modificación de la proteína AKR1B10 por PGA <sub>1</sub> -B en células COS-7	85
8.- CARACTERIZACIÓN DE LA REPERCUSIÓN FUNCIONAL DE LA MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR PGA <sub>1</sub>	87
8.1.- Efecto de PGA <sub>1</sub> sobre la actividad enzimática de AKR1B10	87
8.2.- Estudio de la importancia de los residuos Cys299, Tyr49 y His111 en la inhibición de AKR1B10 por PGA <sub>1</sub>	89
9.- EFECTO DE DIVERSAS PG CON ESTRUCTURA CICLOPENTENONA Y DE INHIBIDORES CONOCIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE AKR1B10	91
10.- ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE LA MODIFICACIÓN E INHIBICIÓN DE AKR1B10 POR PGA <sub>1</sub> -B EN CÉLULAS COS-7	91
11.- ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE OTRAS AKR POR PGA <sub>1</sub> -B EN CÉLULAS COS-7	94
12.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN E INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR PGA <sub>1</sub> EN UN MODELO CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN	94
12.1.- Efecto de los niveles de GSH en la modificación e inhibición de proteínas AKR por PGA <sub>1</sub> en las células A549	95
13.- EFECTOS DE PGA <sub>1</sub> EN LAS CÉLULAS A549	99
13.1.- Efecto de PGA <sub>1</sub> sobre la viabilidad de las células A549	99
13.2.- Efecto de PGA <sub>1</sub> sobre el ciclo celular de las A549	100
13.3.- Efecto de PGA <sub>1</sub> sobre la inducción de apoptosis en las células A549	100
14.- EFECTO DE LA PGA <sub>1</sub> SOBRE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LAS CÉLULAS A549	102
14.1.- Efecto de PGA <sub>1</sub> sobre la migración de las células A549	102
14.2.- Efecto de la PGA <sub>1</sub> sobre el crecimiento de colonias en agar de A549	104
15.- EFECTO DE PGA <sub>1</sub> EN LA QUIMIORRESISTENCIA DE LAS CÉLULAS A549 AL FÁRMACO ANTITUMORAL DOXORRUBICINA	105

Discusión	111
1.- INTERACCIÓN DE LA $\text{PGA}_1$ CON LA PROTEÍNA AKR1B1	113
1.1.- Modificación de la proteína AKR1B1 por $\text{PGA}_1$	114
1.2.- Inhibición de la actividad AKR1B1 por $\text{PGA}_1$	115
1.3.- Irreversibilidad de la inhibición de AKR1B1 por $\text{PGA}_1$	117
2.- INTERACCIÓN DE $\text{PGA}_1$ -B CON LA PROTEÍNA AKR1B1	118
3.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA INTERACCIÓN DE CYPG CON LA AKR1B1	120
3.1.- Inhibición de AKR1B1 por otros compuestos	122
4.- EFECTO DE NADP/NADPH SOBRE LA INHIBICIÓN DE AKR1B1 POR $\text{PGA}_1$	122
5.- CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LA $\text{PGA}_1$ CON LA PROTEÍNA AKR1B10	124
5.1.- Modificación de la proteína AKR1B10 por $\text{PGA}_1$	125
5.2.- Factores estructurales implicados en la interacción de $\text{PGA}_1$ con AKR1B10	127
6.- SELECTIVIDAD DE LA MODIFICACIÓN DE LA AKR1B10 POR $\text{PGA}_1$ EN CÉLULAS COS-7	129
7.- SELECTIVIDAD DE MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS AKR POR $\text{PGA}_1$	130
8.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN E INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR $\text{PGA}_1$ EN UN MODELO CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN	131
8.1.- Efecto del GSH en la interacción de $\text{PGA}_1$ con proteínas AKR en las células A549	132
9.- POSIBLES MECANISMOS DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE $\text{PGA}_1$ EN LAS CÉLULAS A549	134
Conclusiones	139
Bibliografía	143

## **Abreviaturas**



15d-PGJ <sub>2</sub>	15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J <sub>2</sub>
15d-PGJ <sub>2</sub> -B	15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J <sub>2</sub> -biotinilada
4-ONE	4-oxo-2-nonenal
AA	Ácido araquidónico
ACCA	Acetil-CoA carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKR	Aldo-ceto reductasas
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1
APS	Persulfato amónico
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
BSO	Butionina sulfoximina
CAY10410	9,10-dihidro-15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ <sub>2</sub>
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
COX	Ciclooxigenasa
cyPG	Prostaglandina ciclopentenona
DAN	Daunorrubicina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato



DHA	Ácido docosaheptaenoico
DHN	1,4-dihidroxi-2-noneno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DTT	Ditiotreitol
ECL	Sustrato quimioluminiscente
EDTA	Ácido disodioetilenodiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenobis(oxietilenonitrilo)tetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
FBS	Suero fetal bovino
GADD153	Gen 153 inducible por daño en el DNA
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamil cisteinil sintetasa
GS	Glutación oxidado
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación S-transferasa
GSTP1-1	Glutación S-transferasa P1-1
GTP	Guanosín trifosfato

HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
HO-1	Hemooxigenasa 1
HSF	Factor de choque térmico
Hsp-70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HRP	Peroxidasa de rábano
IAA	Iodoacetamida
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria del 50%
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1
IKK	Quinasa IκB
IP	Ioduro de propidio
IsoP	Isoprostano
I/R	Isquemia/Reperfusión
JNK	Quinasa del N-terminal de c-Jun
kDa	kilodalton
Keap-1	Proteína 1 similar a Kelch
LBD	Dominio de unión a ligandos
LC	Cromatografía líquida
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido

<i>m/z</i>	Cociente de masa/carga
MALDI	Ionización/desorción mediante láser, asistida por matriz
MDR1	Proteína de resistencia a fármacos 1 o glicoproteína-P
MDR	Resistencia a múltiples fármacos
Mm	Masa molecular
MRP1	Proteína de resistencia a fármacos 1
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADP+	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato reducido
NF-κB	Factor nuclear κB
Nfr2	Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
NP-40	Nonidet P-40
NSAIDS	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
ORE	Elemento de respuesta osmótica
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PG	Prostaglandina
PGA <sub>1</sub>	Prostaglandina A <sub>1</sub>
PGA <sub>1</sub> -B	Prostaglandina A <sub>1</sub> biotinilada
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR	Receptor activado por inductores de proliferación peroxisomal
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Polivinilideno de flúor
RA	Ácido retinoico
RAR	Receptor de ácido retinoico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor X de retinoides
S100	Fracción celular soluble
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Tris acetato EDTA
TBS	Tampón tris salino

TEMED	N,N,N',N,-tetrametilendiamida
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
TOF	Tiempo de vuelo
Top	Topoisomerasa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
T-TBS	Tween-tampón tris salino
WT	Genotipo silvestre

## **Resumen**



Las prostaglandinas ciclopentenonas (cyPG), como  $\text{PGA}_1$  y  $15\text{d-PGJ}_2$ , son mediadores lípidos endógenos que proceden de la deshidratación espontánea de otras prostaglandinas (PG). Estos compuestos ejercen efectos antiinflamatorios y antitumorales. Debido a su elevada reactividad, el principal mecanismo de acción de estos compuestos es la unión covalente a proteínas celulares mediante la adición de Michael.

Mediante el uso de abordajes proteómicos, en nuestro grupo de investigación se identificaron proteínas de la superfamilia de las AKR como dianas selectivas de la  $\text{PGA}_1$ . Las AKR son enzimas de metabolismo de fase I que catalizan la oxidorreducción de compuestos tanto endógenos como xenobióticos.

En este trabajo hemos caracterizado la modificación por  $\text{PGA}_1$  de dos proteínas AKR con una elevada importancia fisiopatológica, la aldosa reductasa o AKR1B1 y la AKR1B10, y la repercusión biológica de esta modificación. La aldosa reductasa está implicada en las complicaciones diabéticas secundarias, y la AKR1B10 está implicada en el desarrollo de tumores relacionados con el consumo de tabaco. Hemos demostrado que la  $\text{PGA}_1$  se une a la proteína recombinante AKR1B1 e inhibe su actividad enzimática. Además, hemos comprobado que la  $\text{PGA}_1$  se une covalentemente a la proteína AKR1B10 a través del residuo de Cys299 presente en el centro activo de la enzima, e inhibe su actividad enzimática en células. También hemos observado que la  $\text{PGA}_1$  inhibe la migración *in vitro* y el crecimiento de colonias en agar de las células A549, y potencia los efectos inducidos por la doxorrubicina (DOX) en estas células. Estos efectos podrían estar potencialmente mediados por la inhibición de la proteína AKR1B10.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevas evidencias que ayudan a la comprensión de los mecanismos de acción de las cyPG, confirman la importancia de sus propiedades antitumorales y antiproliferativas, y apoyan su uso como potenciales fármacos para el tratamiento de diferentes patologías en humanos.





## **Introducción**



La inflamación es un proceso fisiopatológico mediante el que el organismo responde a la presencia de agentes patógenos o cualquier otro daño tisular. Sin embargo, una situación de inflamación prolongada puede resultar perjudicial para el organismo, y puede provocar el desarrollo de enfermedades. Por lo tanto, procesos de resolución de la inflamación son necesarios para mantener la homeostasis en el organismo. Al contrario de lo que se creía hace algunos años, la resolución de la inflamación es un proceso altamente organizado y coordinado, en el que están implicados un gran número de mediadores endógenos. Entre ellos se encuentran los mediadores lipídicos, compuestos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), como el ácido aráquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) o ácido docosahexaenoico (DHA), que por acción de enzimas como la ciclooxigenasa (COX) o la lipooxigenasa (LOX), generan agentes lipídicos con potentes acciones antiinflamatorias. Ejemplos de estos compuestos son las lipoxinas, las resolvinas, las protectinas o las prostaglandinas ciclopentenonas (cyPG). Algunos de estos compuestos, como las cyPG, son lípidos electrófilos, los cuales presentan una elevada reactividad que les permite reaccionar con biomoléculas endógenas de forma no covalente o covalente (Gilroy et al., 2004; Serhan, 2008; Spite and Serhan, 2010).

Durante los procesos inflamatorios se generan situaciones de alto estrés oxidativo, en las que se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Estas moléculas pueden provocar la oxidación y peroxidación no enzimática de biomoléculas, como los PUFAs, generando también lípidos electrófilos de diferente naturaleza, algunos de ellos, con potentes acciones antiinflamatorias. La modificación postraduccional de proteínas celulares es el principal mecanismo de acción de los lípidos electrófilos, lo que genera cambios en la función, la actividad o la localización subcelular de la proteína, que da lugar a la regulación de diferentes rutas de señalización. Además, estas modificaciones son procesos selectivos y regulados, que dependen de diferentes factores (Koenitzer and Freeman, 2010; Schopfer et al., 2011). En los últimos años, el interés en los lípidos electrófilos con propiedades antiinflamatorias ha ido en aumento, ya que el conocimiento de la estructura de estos compuestos y de sus dianas celulares, así como de los mecanismos de acción tiene una elevada importancia clínica, pues contribuye a comprender los procesos de resolución

de la inflamación y permite desarrollar nuevos compuestos antiinflamatorios basados en estos mediadores endógenos.

En muchos casos, además, las dianas identificadas de estos compuestos han resultado ser proteínas con importantes implicaciones fisiopatológicas, cuyo estudio y caracterización puede ayudar a conocer la biología de algunas enfermedades, con el fin de mejorar las terapias ya existentes (Díez-Dacal et al., 2011; Garzón et al., 2011).

## 1.- LAS PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS

Las cyPG son mediadores lipídicos endógenos con una importante actividad antiinflamatoria. Además, poseen efectos antitumorales que han sido observados tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que se les considera potenciales compuestos terapéuticos en el tratamiento de tumores y otras patologías inflamatorias.

Las cyPG presentan unas propiedades comunes con otros lípidos electrófilos y por ello han sido usados como modelos para el estudio de las dianas y mecanismos de acción de estos compuestos. De hecho, recientemente se ha confirmado que especies lipídicas como ácidos grasos nitrados o isoprostanos se unen covalentemente a los mismos residuos que las cyPG en proteínas clave en señalización celular.

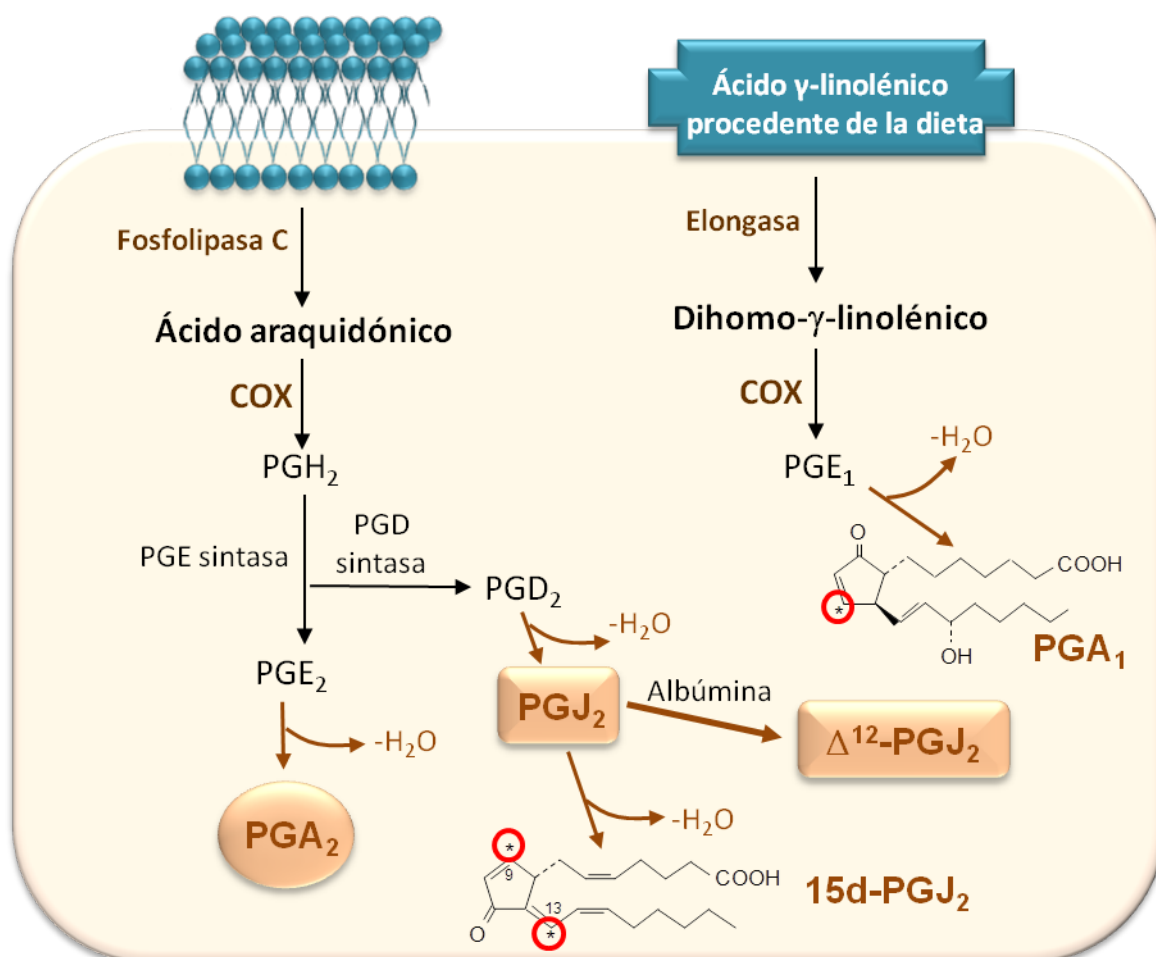
### 1.1.- Síntesis de las cyPG

Las cyPG se sintetizan a partir de la deshidratación espontánea de otras prostaglandinas (PG) (Figura 1). Las prostaglandinas de la serie A,  $PGA_1$  y  $PGA_2$ , proceden de PG de tipo PGE,  $PGE_1$  y  $PGE_2$ , respectivamente, y las de la serie J proceden de la  $PGD_2$ . La deshidratación de  $PGD_2$  da lugar a la formación de  $PGJ_2$ , que posteriormente por deshidratación puede dar a lugar a la  $15d-PGJ_2$  (Díez-Dacal and Pérez-Sala, 2010; Straus and Glass, 2001). A su vez, en presencia de albúmina, la  $PGJ_2$  genera  $\Delta^{12}-PGJ_2$  (Shibata et al., 2002).

### 1.2.- Niveles de cyPG *in vivo*

Las cyPG están presentes en fluidos biológicos como orina, suero o plasma, en condiciones fisiológicas, en niveles del orden de picomolar a nanomolar (Hirata et al., 1988; Jaffe et al., 1973). Por otro lado, las cyPG también están presentes *in vivo* en situaciones patológicas asociadas con inflamación aguda o crónica. Se han detectado cyPG en condrocitos de pacientes con osteoartritis o artritis reumatoide (Shan et al.,

2004), o en placas de ateroma de pacientes con lesiones ateroscleróticas (Shibata et al., 2002). Los niveles de cyPG aumentan en plasma de pacientes con isquemia cerebral aguda (Blanco et al., 2005), en neuronas de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Kondo et al., 2002) o en la fase tardía de la inflamación en un modelo de pleuritis inducida por carragenina en ratas (Gilroy et al., 1999).



**Figura 1.- Biosíntesis de las cyPG.** La  $PGA_1$  y  $PGA_2$  se sintetizan por deshidratación de la  $PGE_1$  y  $PGE_2$ , respectivamente. La  $PGD_2$  da lugar a la  $PGJ_2$  por deshidratación. Ésta, a su vez da lugar a la  $15d-PGJ_2$  y a  $\Delta^{12}-PGJ_2$  en presencia de albúmina. Aparecen señalados con un círculo rojo los carbonos electrófilos presentes en la  $PGA_1$  y en la  $15d-PGJ_2$ .

En la medida de los niveles de las cyPG *in vivo* se han utilizado generalmente técnicas de radioinmunoensayo y ensayo inmunoenzimático, aunque estos métodos en algunos casos presentan muchas limitaciones debido a la falta de especificidad de los anticuerpos empleados. Recientemente se están empezando a utilizar técnicas de espectrometría de masas (MS), ya que ofrecen mayor precisión y fiabilidad (Liu et al., 2011).

### **1.3.- Mecanismos de acción**

Las cyPG llevan a cabo sus efectos biológicos a través de la interacción con receptores, tanto de membrana como nucleares, y con diferentes factores de transcripción implicados en numerosas rutas de señalización. Además gracias a su carácter electrófilo, la mayoría de sus acciones las llevan a cabo mediante la modificación covalente de dianas celulares.

#### ***1.3.1.- Modificación de proteínas celulares***

La característica estructural más importante de las cyPG es la presencia de un anillo ciclopentano con un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado. Esta estructura le confiere al carbono en posición- $\beta$  una reactividad electrófila que le hace susceptible de reaccionar con grupos nucleófilos, como los tioles presentes en los residuos de cisteína de las proteínas o los tioles solubles como el GSH, dando lugar a aductos covalentes por la reacción conocida como la adición de Michael. Algunas cyPG tienen además un segundo carbono electrófilo en la cadena lateral, y se las denomina dienonas, frente a las enonas sencillas (Figura 1).

A comienzos de los años 80, varios grupos de investigación sugirieron que los efectos biológicos de las cyPG eran debidos a la presencia del carbono electrófilo en su estructura (Fitzpatrickz and Wynalda, 1983; Fukushima et al., 1982; Honn and Marnett, 1985). En 1987, Narimuya y cols., utilizando cyPG marcadas radiactivamente, describieron las primeras evidencias que determinaban que las cyPG se unen covalentemente a proteínas celulares (Narumiya et al., 1987). Actualmente se han identificado aproximadamente unas 100 dianas celulares, potenciales o confirmadas, de las cyPG. La identificación y caracterización de las dianas celulares de las cyPG es esencial en el conocimiento de sus funciones celulares, así como de sus mecanismos de acción. Es, por lo tanto de gran importancia el desarrollo de nuevas metodologías que permitan identificar y analizar las dianas de estos mediadores lipídicos.

#### ***1.3.2.- Interacción con receptores de membrana***

Se ha descrito que las cyPG de la serie J son agonistas de los receptores de la  $PGD_2$ , DP1 y DP2 (CRTH2), con menor afinidad que la  $PGD_2$  aunque en algunos casos con afinidad en el rango de nanomolar (Sawyer et al., 2002; Wright et al., 1998). Por ejemplo, la 15d-PGJ<sub>2</sub> puede desencadenar la activación de eosinófilos a través de su

interacción selectiva con el receptor DP2 expresado en dichas células (Monneret et al., 2002). Además, la 15d-PGJ<sub>2</sub> puede actuar como ligando del receptor nociceptivo TRPA1, canal catiónico perteneciente a la familia de receptores de potencial transitorio (TRP), que se expresa en neuronas. En este caso se ha descrito que la activación se produce mediante la modificación directa de dos residuos de cisteína presentes en el receptor (Takahashi et al., 2008).

### ***1.3.3.- Interacción con receptores nucleares***

Los receptores activados por inductores de la proliferación peroxisomal (PPAR), pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y están implicados en la regulación del metabolismo lipídico, el metabolismo de glucosa y la diferenciación de adipocitos. Además estos receptores están implicados en la regulación de la inflamación. Se conocen tres tipos de receptores PPAR:  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  (Blanquart et al., 2003). En 1995, Forman y cols. describieron por primera vez la 15d-PGJ<sub>2</sub> como ligando del receptor PPAR $\gamma$  (Forman et al., 1995). Posteriormente se comprobó que también podía activar PPAR $\alpha$  y  $\delta$  (Forman et al., 1997).

Se sabe que la 15d-PGJ<sub>2</sub> activa PPAR $\gamma$  mediante la modificación covalente de la Cys285 presente en el dominio de unión al ligando (LBD) del receptor. Dicha modificación genera un cambio conformacional en el sitio de unión al ligando, que es esencial para la activación del receptor (Shiraki et al., 2005; Shiraki et al., 2006; Waku et al., 2009).

Las prostaglandinas de la serie A también pueden activar los receptores PPAR en células, aunque se ha propuesto que no son ligandos (Forman et al., 1997; Yu et al., 1995).

### ***1.3.4.- Interacción con diversos factores de transcripción***

El factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) es un factor de transcripción que se activa en respuesta a varios estímulos que incluyen estrés oxidativo, inflamación o presencia de algunos patógenos. La activación de NF- $\kappa$ B se ha asociado con varios aspectos del desarrollo tumoral tales como proliferación celular, inhibición de apoptosis, angiogénesis o metástasis (Karin, 2006).

Se ha descrito que las cyPG pueden inhibir el factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediante la modificación covalente e inactivación de la quinasa reguladora de NF- $\kappa$ B, IKK. Además, pueden interaccionar con el dominio de unión al DNA de las



subunidades p65 y p50 que conforman el factor (Cernuda-Morollón et al., 2001; Rossi et al., 2000; Straus et al., 2000).

Las cyPG también pueden interaccionar con la proteína activadora 1 (AP-1), factor de transcripción que está implicado en múltiples procesos celulares que incluyen diferenciación, proliferación y apoptosis. Este factor de transcripción puede existir como homo o heterodímero, compuesto por proteínas pertenecientes a las familias de Jun (c-Jun, JunB y Jun D) y Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2). La 15d-PGJ<sub>2</sub> puede interaccionar con c-Jun a través de un residuo de cisteína presente en el dominio de unión al DNA. También puede interaccionar con c-Fos, inhibiendo su actividad (Pérez-Sala et al., 2003).

Las cyPG pueden modular la vía de activación del factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2). Este factor regula la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta antioxidante y/o antiinflamatoria, tales como la  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa ( $\gamma$ -GSC), la hemooxigenasa-1 (HO-1), las glutatión S-transferasas (GST), las aldo-ceto reductasas (AKR), etc. En condiciones basales, Nrf2 está unido en el citoplasma a la proteína Keap1, que promueve su degradación por la vía del proteasoma. Las cyPG pueden interaccionar directamente con Keap1, favoreciendo la liberación de Nrf2 y su translocación al núcleo para la transcripción de los genes diana (Kansanen et al., 2009; Levonen et al., 2004).

Además de la interacción directa con dianas celulares, las cyPG pueden regular la actividad de los diferentes factores de transcripción de forma indirecta. Dado su carácter electrófilo, pueden inducir estrés oxidativo en la célula mediante diferentes mecanismos, lo que puede regular también la actividad de factores de transcripción sensibles a redox como los ya mencionados: Nrf2, NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, etc. (Díez-Dacal and Pérez-Sala, 2010).

#### **1.4.- Selectividad de la modificación de proteínas por cyPG**

La modificación de proteínas por las cyPG es un proceso que depende tanto de la estructura de la proteína como de la cyPG. En primer lugar, las cyPG se diferencian estructuralmente en sus cadenas laterales y en el número de carbonos electrófilos en su estructura (Figura 1). CyPG con distinta estructura pueden tener diferentes dianas celulares (Díez-Dacal et al., 2011; Gayarre et al., 2005). Además, dicha selectividad se puede dar también entre residuos dentro de una misma proteína. CyPG con estructura dienona modifican la proteína H-Ras preferentemente en dos residuos de cisteína que

ocupan posiciones próximas en el extremo C-terminal de la proteína. Sin embargo, cyPG con estructura de enona sencilla se unen preferentemente a la cisteína que se encuentra en el sitio de unión a GTP (Renedo et al., 2007). En el caso de la proteína Keap1 se han realizado observaciones similares. Mientras que una cyPG con estructura dienona, 15d-PGJ<sub>2</sub>, se une covalentemente a los residuos Cys273 y Cys288, una cyPG con estructura de enona sencilla, PGA<sub>2</sub>, se une a las Cys273, Cys297 y Cys489 (Kobayashi et al., 2009).

Por otro lado, las cyPG con dos carbonos electrófilos en su estructura pueden modificar simultáneamente dos residuos de cisteína de la misma o de diferentes proteínas, dando lugar a uniones intra o inter-moleculares. Este fenómeno ocurre en proteínas como GSTP1-1 (Sánchez-Gómez et al., 2010), c-Jun (Pérez-Sala et al., 2003) y tioredoxina (Shibata et al., 2003).

Otro factor que influye en la selectividad es el entorno de las cisteínas que son modificadas dentro de una misma proteína. Las cisteínas con un pKa más bajo son más susceptibles de ser modificadas por las cyPG. Sin embargo, aunque existen algunas homologías o características comunes entre las secuencias adyacentes a las cisteínas que son modificadas por las cyPG, todavía no existe una secuencia consenso bien definida que permita predecir la cisteína a la que se va a unir una cyPG en una proteína. Sí se ha descrito que en general un pH bajo en las proximidades de la cisteína favorece la estabilidad de los aductos (Bickley et al., 2004).

El contexto biológico en el que ocurre la modificación de proteínas por cyPG también es de gran importancia. Los niveles de glutatión (GSH) o el estado redox de la célula modulan dicha modificación. Ya en los años 70, Cagen y cols. describieron que las cyPG podían conjugarse con GSH de forma no enzimática o bien, catalizada por enzimas como las GST (Cagen et al., 1975). Los aductos cyPG-GSH pueden ser exportados por proteínas de resistencia a fármacos (MRP1), disminuyendo la concentración de cyPG en la célula y su actividad biológica (Atsmon et al., 1990; Bogaards et al., 1997; Evers et al., 1997; Honn and Marnett, 1985; Paumi et al., 2003). Sin embargo, la formación de aductos con GSH u otros tioles en algunos casos puede favorecer las acciones biológicas de las cyPG (Bickley et al., 2004; van Iersel et al., 1999). Por lo tanto, la presencia de GSH puede afectar a la modificación de proteínas por cyPG. Se ha demostrado que la naturaleza del efecto del GSH depende de la estructura tanto de la proteína como de la PG de forma que, en algunos casos la presencia de GSH aumenta la modificación de proteínas por las cyPG y en otros la

disminuye. En esta variabilidad influyen diversos factores que incluyen la diferente reactividad de las PG frente a GSH, posibles cambios conformacionales en las proteínas o cambios en el estado redox que el GSH pueda inducir. Por lo tanto, la modificación de proteínas por cyPG depende de interacciones moleculares complejas en el contexto celular (Gayarre et al., 2007; Gayarre et al., 2005).

### **1.5.- Efectos biológicos**

Las cyPG ejercen efectos antiproliferativos mediante distintos mecanismos que dependen del sistema biológico. Estos mecanismos principalmente incluyen la inducción de apoptosis y la modulación del ciclo celular, a través de la interacción con diferentes proteínas reguladoras (Díez-Dacal and Pérez-Sala, 2010; Garzón et al., 2011).

Las cyPG desempeñan efectos antiinflamatorios y participan en la resolución de la inflamación (Díez-Dacal and Pérez-Sala, 2010). Los efectos antiinflamatorios de las cyPG se atribuyeron inicialmente a la activación del factor de transcripción PPAR $\gamma$ . Sin embargo, también se han descrito varios mecanismos independientes de PPAR, como la interacción con NF- $\kappa$ B y AP-1, o la inducción de HO-1 (Cernuda-Morollón et al., 2001; Lee et al., 2003; Pérez-Sala et al., 2003).

Los efectos antivirales de las cyPG se han atribuido en parte a la inhibición de NF- $\kappa$ B, ya que dicho factor es necesario para la expresión y replicación de ciertos virus. Además, la interrupción de la glicosilación de proteínas virales o la inducción de la proteína de respuesta a choque térmico Hsp-70, son otros mecanismos por los que las cyPG pueden inhibir la replicación de diferentes virus (Rossi et al., 1997; Santoro, 1997).

Sin embargo, aparte de los efectos biológicos bien establecidos de las cyPG, estos mediadores también pueden ejercer efectos opuestos en distintos sistemas o incluso bifásicos en los mismos modelos experimentales. Así, en algunos casos las cyPG pueden desencadenar procesos inflamatorios o inducir proliferación celular que promueve el desarrollo de tumores. En células mesangiales como modelo de inflamación se observó que la 15d-PGJ<sub>2</sub>, a concentraciones en el rango nanomolar, inducía un aumento en los niveles de proteínas proinflamatorias, como la óxido nítrico sintasa (iNOS) o la COX-2, además de un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO), mientras que a concentraciones micromolares se producía una disminución en los niveles de dichas proteínas (Martínez et al., 2012). Este efecto bifásico se ha observado también con proteínas de choque térmico, como Hsp-70 (Garzón et al., 2010). Por lo

tanto, los efectos de las cyPG dependen del contexto celular que se estudie y de la concentración y el tiempo de exposición en el sistema biológico (Kim et al., 2008b; Koharudin et al., 2010). Estas observaciones ilustran la complejidad de los efectos y mecanismos de acción de las cyPG.

## **2.- LOS ISOPROSTANOS**

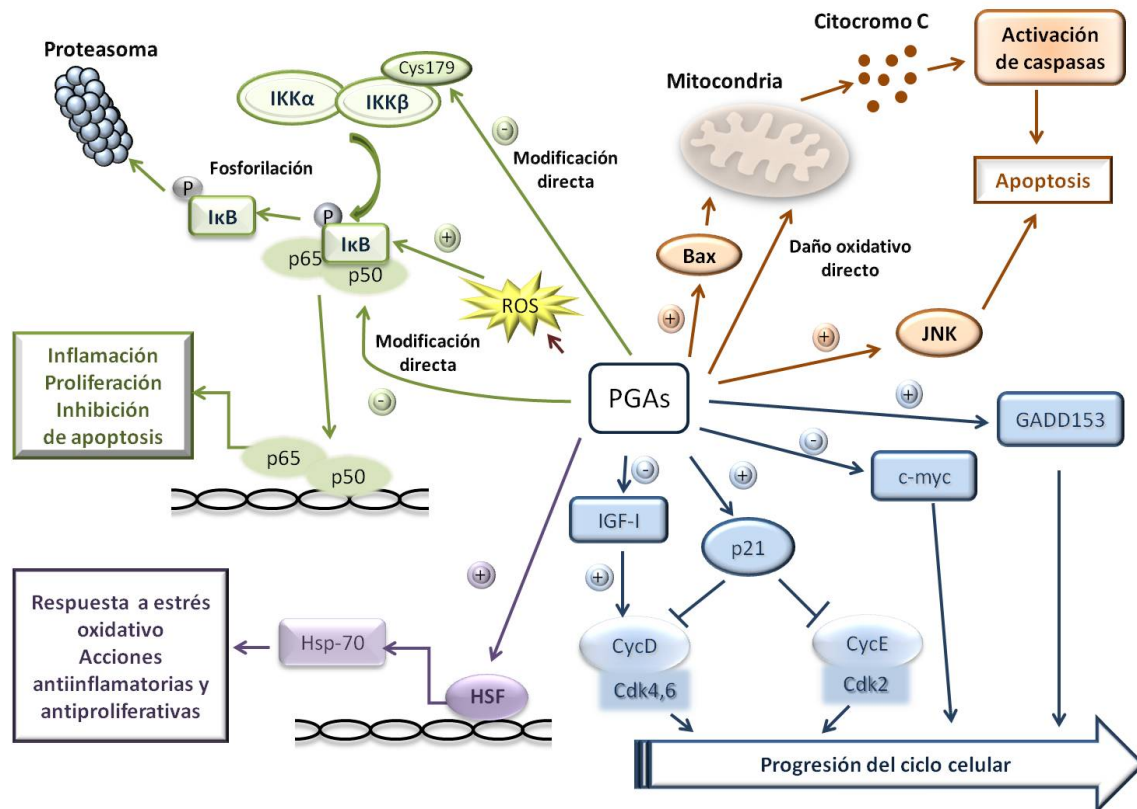
Los isoprostanos (Isop) son compuestos estructuralmente análogos a las PG, que se generan en condiciones de estrés oxidativo por peroxidación del AA u otros ácidos grasos insaturados mediada por radicales libres, independientemente de la vía de las COX. La principal diferencia con las PG es que éstas tienen las cadenas laterales orientadas en sentido *trans* con respecto al anillo prostano, mientras que los isoprostanos las tienen en sentido *cis*.

Desde el descubrimiento de los F2-IsoP en 1990 por Marrow y cols., numerosos Isop con diferentes estructuras han sido identificados posteriormente. La función de estos compuestos es principalmente la de mediadores del daño oxidativo, y actualmente los F2-IsoP son utilizados como biomarcadores endógenos de estrés oxidativo *in vivo*, ya que pueden ser detectados con facilidad en numerosos tejidos y fluidos biológicos (Milne et al., 2011).

## **3.- LAS PROSTAGLANDINAS DE LA SERIE A**

Las cyPG de la serie A (PGAs) fueron descubiertas por primera vez en los años 60 en plasma seminal humano (Hamberg and Samuelsson, 1966). Poco tiempo después, se encontraron niveles de PGA<sub>1</sub> en el rango de nanomolar en plasma humano. Posteriormente, varios grupos de investigación desarrollaron diferentes metodologías que mejoraron las técnicas de extracción y cuantificación de estas PG en los fluidos biológicos humanos (Jaffe et al., 1973; Golub et al., 1974; Zusman et al., 1974). Sin embargo, es sorprendente que desde entonces, no se hayan publicado más trabajos en los que se exploren los niveles de las PGAs *in vivo*.

Inicialmente se propuso que las PGAs podrían regular la presión sanguínea renal y la natriuresis, y actuar así como antihipertensores en el riñón (Lee et al., 1976). Sin embargo, el mayor interés de estos compuestos en la fisiopatología humana deriva de sus potentes acciones antitumorales.



**Figura 2.- Mecanismos antitumorales de las PGAs.** Las PGAs pueden inducir apoptosis a través de la interacción directa con la mitocondria o la activación de proteínas reguladoras de muerte celular. Las PGAs pueden ejercer efectos antiinflamatorios y antiproliferativos a través de la activación de Hsp-70, o de la interacción con diferentes componentes de la ruta de señalización de NF-κB. Las PGAs también pueden regular el ciclo celular a través de la interacción con diferentes proteínas reguladoras del ciclo.

### 3.1.- Efectos antitumorales de las PGAs

Hacia los años 70, se describió por primera vez el papel antitumoral de las PGAs (Eisenbarth et al., 1974; Stein-Werblowsky, 1974), que fue corroborado años más tarde en numerosos modelos experimentales. Se demostró que las PGAs inhibían la proliferación, así como la formación de colonias en agar de células procedentes de melanoma humano (Bhuyan et al., 1986; Bregman and Meyskens, 1983; Honn and Marnett, 1985). Además, la administración intraperitoneal de las PGAs prolongaba la supervivencia de ratones a los que se les habían inoculado células tumorales (Kato et al., 1986). Desde el descubrimiento de los efectos antitumorales de las PGAs, muchos han sido los estudios que se han realizado con el fin de dilucidar sus mecanismos de acción.

Inicialmente, se postuló que la inhibición del crecimiento celular estaba asociada a un aumento en los niveles de AMPc y a una inhibición en la síntesis del DNA. Sin embargo, poco después se demostró que dichos efectos no guardaban correlación con las acciones antitumorales (Bhuyan et al., 1986; Santoro et al., 1986).

En la figura 2 se muestra un esquema de los mecanismos propuestos por los que las PGAs ejercen efectos antitumorales. Múltiples evidencias han demostrado que existe una asociación entre los efectos antiproliferativos de las PGAs y el bloqueo del ciclo celular en la fase G1. Dicho efecto está relacionado con la modulación de diferentes proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, como el proto-oncogen c-myc (Ishioaka et al., 1988), el factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-I) (Bui et al., 1997), el gen 153 inducible por daño en el DNA (GADD153) (Choi et al., 1992), las ciclinas D y E, las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) 4,6 y 2 o p21 (Gorospe and Holbrook, 1996).

La proteína de choque térmico Hsp-70 ejerce un papel muy importante en la respuesta a estrés oxidativo en la célula, aunque también ha sido asociada con procesos de replicación del DNA y proliferación celular. Se ha descrito que la inhibición de la proliferación por PGA<sub>1</sub> se correlaciona con la activación del factor de transcripción HSF, el cual regula la expresión de Hsp-70 (Holbrook et al., 1992; Amici et al., 1992). Hsp-70 se une y estabiliza la región 5'-UTR del RNAm de la proteína supresora de tumores, SMAR1, dando lugar a un aumento en la síntesis de dicha proteína, la cual induce efectos antiproliferativos en la célula (Pavithra et al., 2010).

Los efectos antitumorales de las PGAs también se han asociado con la inducción de muerte celular por apoptosis. Las PGAs pueden inducir apoptosis mediante varios mecanismos que incluyen el aumento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax (Joubert et al., 2006; Joubert et al., 2005), la interacción directa de la cyPG con la mitocondria (Lee et al., 2010) o la activación de la proteína JNK (Liu et al., 2003).

Las PGAs también llevan a cabo sus efectos antitumorales a través de la regulación de NF- $\kappa$ B. Se ha descrito un mecanismo indirecto por el que la PGA<sub>1</sub> podría inhibir a NF- $\kappa$ B. La presencia en la célula de esta PG induciría una respuesta a estrés oxidativo dada su alta reactividad, lo que provocaría un aumento en la expresión de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , produciendo así la inhibición de NF- $\kappa$ B (Thomas et al., 1998). Además la PGA<sub>1</sub> puede inhibir NF- $\kappa$ B por otros mecanismos. La PGA<sub>1</sub> puede inhibir la activación de NF- $\kappa$ B mediante la modificación covalente de IKK $\beta$  en el residuo de

Cys179 (Rossi et al., 2000) e interaccionar con la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B, inhibiendo su unión al DNA (Cernuda-Morollón et al., 2001; Stamatakis et al., 2006).

### 3.2.- Desarrollo de compuestos derivados de PGAs

En los años 80 se sintetizaron numerosos compuestos con estructura análoga a las PGAs con el fin de mejorar sus efectos antitumorales, reducir los efectos secundarios observados en algunos modelos animales y mejorar su estabilidad, ya que la presencia de una enzima isomerasa en suero capaz de metabolizar las PGAs a PG de clase B y C, reduce sus acciones antitumorales (Polet and Levine, 1974).

Kato y cols. sintetizaron y caracterizaron numerosos derivados estructurales de la PGA<sub>1</sub>. Entre ellos, el compuesto  $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub>, con un doble enlace entre C<sub>7-8</sub>, resultó mucho más citotóxico que PGA<sub>1</sub> tanto *in vitro* como *in vivo* (Kato et al., 1986). Este estudio supuso la base para la síntesis de otros compuestos derivados de las PGAs con capacidad antitumoral más potente. En la figura 3 se muestran algunos de los compuestos sintetizados más relevantes. Entre ellos destacan por ejemplo, un derivado estructural de  $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub>,  $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub>-metil-éster, el cual inhibió eficazmente la proliferación de una línea celular de leucemia, a través de la inducción de p21 (Ishikawa et al., 1998). El compuesto 13,14-dihidro-15-desoxi- $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub>-metil éster (TEI-9826), otro derivado de la  $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub> integrado en lipoesferas, inhibió el crecimiento de células de ovario humanas resistentes a cisplatino inoculadas en ratones (Sasaki et al., 1999). Este compuesto fue posteriormente seleccionado para ensayos clínicos (Fukushima et al., 1998). Por otro lado, se sintetizaron compuestos basados en la estructura de  $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub> pero con combinaciones de configuraciones R y/o S en los estereocentros C12 y C15 como 15-*epi*- $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub>-metil éster (NAG-0092), 12-*iso*- $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub>-metil éster (NAG-0093) o *ent*- $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub>-metil éster (NAG-0022), los cuales resultaron tener potentes efectos antitumorales mediante la parada del ciclo celular en fase G1, por un mecanismo combinado que incluye la inducción de p21 y la inhibición de la ciclina E (Suzuki et al., 1998b; Tanikawa et al., 1998). Todas estas evidencias ponen de manifiesto el gran potencial de compuestos basados en la estructura de las PGAs como importantes agentes antitumorales, así como la relevancia de estudiar las características estructurales requeridas para mejorar la estabilidad y la potencia de estos compuestos.

Además, en la naturaleza también existen compuestos estructuralmente análogos a las PGAs con importantes acciones farmacológicas. Concretamente, prostanoïdes extraídos del coral *Clavularia viridis*, como las clavulonas, han mostrado potentes

efectos antiproliferativos y antitumorales en diferentes tipos celulares (Chiang et al., 2006; Shen et al., 2010).

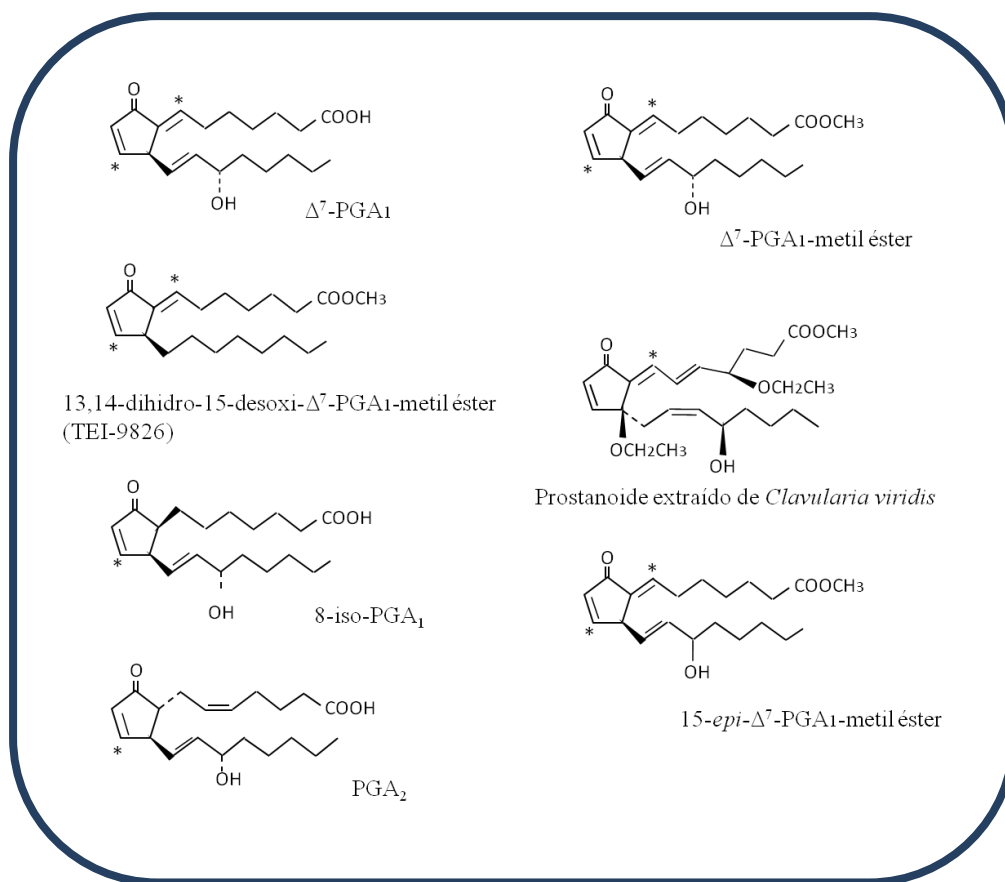


Figura 3.- Estructura de compuestos derivados de las PGAs.

### 3.3.- PGAs en quimiorresistencia

Se han obtenido numerosas evidencias que demuestran que las PGAs y los compuestos derivados son eficaces en situaciones de quimiorresistencia a distintos fármacos antitumorales. Por ejemplo, una línea celular humana de cáncer de ovario resistente a doxorrubicina (DOX) y cisplatino, fue sensible a  $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub> (Sasaki et al., 1991). Por otro lado, la administración de  $\Delta^7$ -PGA<sub>1</sub> en combinación con cisplatino, resultó más eficaz frente a una línea celular de ovario resistente a cisplatino, que la administración de ambos compuestos por separado (Kikuchi et al., 1992). Además, la administración intravenosa de  $\Delta^7$ -PGA-metil-éster integrado en lipoesferas, aumentó la supervivencia de ratones a los que se les habían inoculado células de tumor de ovario humano resistente a cisplatino (Sasaki and Fukushima, 1994). Sin embargo, a pesar de

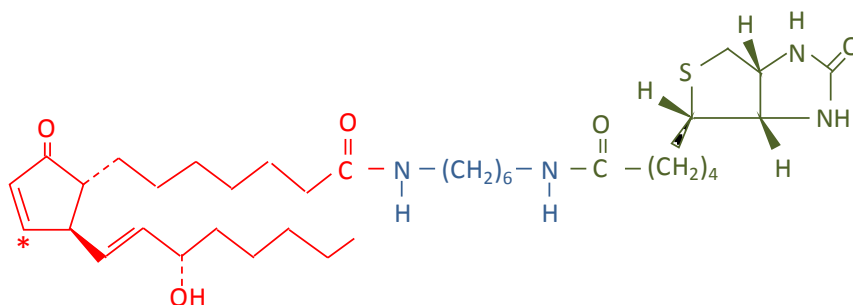


estas evidencias, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que las PGAs resultan efectivas en tumores quimiorresistentes.

#### 4.- ABORDAJES PROTEÓMICOS Y DIANAS CELULARES DE LAS PGAs

En los últimos años, el uso de abordajes proteómicos en la identificación y caracterización de dianas de las cyPG ha supuesto un avance extraordinario en el conocimiento de las acciones y mecanismos de estos mediadores lipídicos. La mejora de las técnicas de MS y el desarrollo de nuevos sistemas de análisis permiten una detección e identificación de las dianas cada vez más sensible y fiable.

Además de las técnicas de MS en la identificación de las dianas, en muchas ocasiones es necesaria la utilización de otras metodologías que permitan su confirmación y caracterización. En concreto, frecuentemente se emplean técnicas de cromatografía en avidina-agarosa, inmunoprecipitación o inmunofluorescencia para dichos fines (Garzón et al., 2010; Liu et al., 2011). Otra metodología ampliamente utilizada es el uso de análogos biotinilados de las cyPG. Numerosas evidencias obtenidas en diferentes grupos de investigación han demostrado que la utilización de los análogos biotinilados constituye una herramienta muy útil en la identificación de dianas de las cyPG (Aldini et al., 2007; Cernuda-Morollón et al., 2001; Gharbi et al., 2007; Parker et al., 1995). Estos análogos biotinilados se caracterizan por poseer una molécula de biotina unida al extremo carboxilo terminal de la cyPG mediante un espaciador, lo que permite preservar la reactividad de la cyPG (Figura 4).



**Figura 4.- Estructura de la PGA<sub>1</sub>-biotinilada.** Se muestra en color rojo la molécula de PGA<sub>1</sub>, en color azul el espaciador, y en color verde la molécula de biotina.

Estos compuestos biotinilados se unen a las proteínas de forma estable, y aunque en algunos casos la molécula de biotina puede interferir en la interacción, en la mayoría

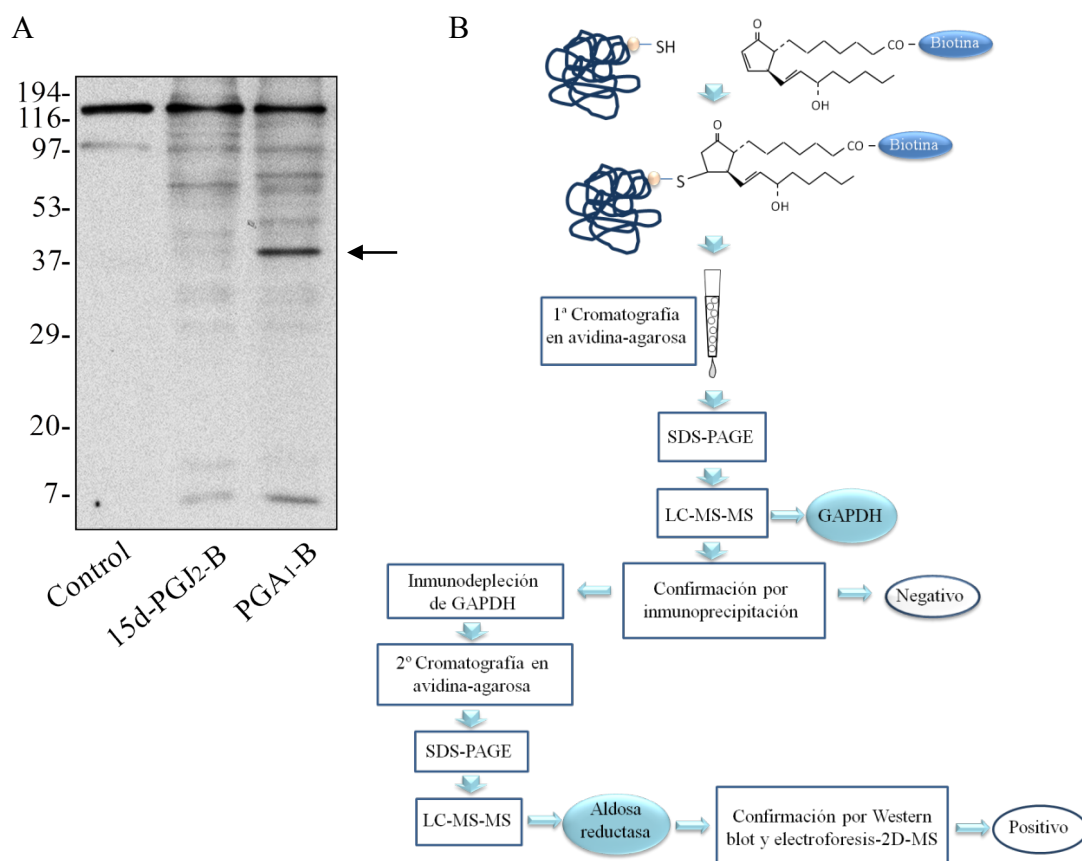
de los casos reproducen los efectos biológicos de la cyPG no biotinilada (Garzón et al., 2010; Stamatakis et al., 2006).

La combinación de abordajes proteómicos y bioquímicos ha permitido la identificación y caracterización de numerosas dianas celulares de las PGAs. Entre las dianas identificadas se encuentran proteínas implicadas en inflamación, respuesta antioxidante o supervivencia celular (Tabla 1).

**Tabla 1.- Dianas celulares identificadas de las PGAs, y sus funciones biológicas.**

Proteína	Función	Referencia
Tiorredoxina	Mantenimiento del estado redox/Respuesta antioxidante	Shibata et al., 2003
Tiorredoxina Reductasa		Cassidy et al., 2006
Keap1		Kobayashi et al., 2009
IKK $\beta$	Inflamación	Rossi et al., 2000
p50 (NF $\kappa$ B)		Cernuda-Morollón et al., 2001; Stamatakis et al., 2006
PPAR		Yu et al., 1995
c-Jun (AP-1)	Supervivencia celular/Apoptosis	Pérez-Sala et al., 2003; Gayarre et al., 2007
BAX		Lalier et al., 2011
PTEN		Covey et al., 2010
H-Ras		Renedo et al., 2007
Hsp-90		Garzón et al., 2010; Gharbi et al., 2007
GSTP1-1	Destoxificación	Gayarre et al., 2007; Sánchez-Gómez et al., 2010
AKR1B10		Díez-Dacal et al., 2011
Factor de elongación-1 $\alpha$	Biosíntesis de proteínas	Garzón et al., 2010; Gharbi et al., 2007
Factor eucariótico de iniciación 4A		Gharbi et al., 2007

En nuestro grupo de investigación se han identificado un gran número de dianas de las cyPG (Garzón et al., 2010). Recientemente, se identificaron en la línea celular de fibroblastos de ratón, NIH-3T3, dos proteínas pertenecientes a la superfamilia de las AKR como dianas selectivas de  $\text{PGA}_1\text{-B}$ : la aldosa reductasa (AKR1B1) y la proteína relacionada con la aldosa reductasa-2 (AKR1B8) (Díez-Dacal et al., 2011). Un resumen del abordaje llevado a cabo para dicha identificación se muestra en la figura 5.



**Figura 5.- Identificación de proteínas modificadas selectivamente por  $\text{PGA}_1\text{-B}$ .** A) Se muestra el resultado del análisis mediante Western blot con estreptavidina peroxidasa de las fracciones S100 procedentes de células NIH-3T3 tratadas con vehículo (DMSO), 15d-PGJ<sub>2</sub>-B (5  $\mu\text{M}$ ) o  $\text{PGA}_1\text{-B}$  (60  $\mu\text{M}$ ). Se puede distinguir el diferente patrón de modificación de proteínas celulares de cada uno de los dos prostanoideos. La flecha señala una banda que aparece a la altura de 37 kDa en la muestra tratada con  $\text{PGA}_1\text{-B}$  y que no aparece en la muestra tratada con 15d-PGJ<sub>2</sub>-B. B) Resumen del abordaje llevado a cabo en la identificación de la proteína correspondiente a la banda que aparece a la altura de 37 kDa en la muestra tratada con  $\text{PGA}_1\text{-B}$ .

## 5.- LAS ALDO-CETO REDUCTASAS

Las AKR constituyen una superfamilia de enzimas que están implicadas en la oxidorreducción de una amplia variedad de compuestos tanto endógenos como exógenos, utilizando NAD(P)(H) como cofactor. Los compuestos que pueden ser sustrato de estas enzimas incluyen aldehídos alifáticos y aromáticos, monosacáridos, esteroides, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), isoflavonoides, etc. Estas enzimas tienen una elevada importancia en la fisiología humana, ya que forman parte de las enzimas de metabolismo de fase I. Sin embargo, su principal interés recae en su implicación en diferentes patologías. Es por esto, que las AKR son frecuentemente objeto de estudio, ya que suponen una diana terapéutica muy importante (Penning and Drury, 2007).

Estructuralmente, las AKR se caracterizan por poseer una estructura tridimensional común en forma de barril ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub>. Los residuos que conforman esta estructura están muy conservados en las AKR, y entre ellos se encuentran los residuos del bolsillo de unión del cofactor NADPH y los residuos que participan en la catálisis enzimática, conocidos como la tétrada catalítica, His110, Tyr48, Lys77 y Asp43 (según su ubicación en la secuencia de la aldosa reductasa), siendo la Tyr48 el donador de protones en la catálisis. Sin embargo, se ha observado que existe cierta variabilidad entre los residuos de la zona C-terminal de la estructura, donde se encuentra el sitio de reconocimiento y unión del sustrato. Parece que esta variabilidad es lo que determina la especificidad de sustrato entre las distintas enzimas (Jez et al., 1997).

Actualmente, se han identificado más de 150 proteínas pertenecientes a esta superfamilia, las cuales están agrupadas en 15 familias según el grado de identidad de secuencia entre ellas, y se denominan AKR1-AKR15. Éstas a su vez, pueden subdividirse en subfamilias. Las AKR se encuentran en múltiples tipos de organismos, desde procariotas hasta eucariotas. Hasta la fecha, se han identificado catorce AKR en humanos, que se han agrupado dentro de las familias AKR1, AKR6 y AKR7 (Hyndman et al., 2003; Mindnich and Penning, 2009; Penning and Drury, 2007).

Dentro de la subfamilia AKR1B, destacan dos proteínas debido a su gran importancia fisiopatológica en humanos: la aldosa reductasa o AKR1B1 y la AKR1B10. Estas proteínas comparten más de un 70% de identidad de secuencia, y tienen una estructura monomérica, un peso molecular de aproximadamente 36 kDa y son citosólicas. Además de los residuos de la tétrada catalítica, estas dos enzimas poseen

otro residuo en común muy importante, el residuo Cys298 en la aldosa reductasa equivalente a la Cys299 en la AKR1B10. Este residuo, ubicado en el centro activo, ejerce un papel muy significativo, ya que participa en la unión del sustrato durante la catálisis, y además estabiliza la unión de algunos inhibidores (Petrash et al., 1992; Verma et al., 2008). En la aldosa reductasa, el residuo Cys298 tiene una importancia adicional, ya que es altamente reactivo y por lo tanto susceptible de sufrir oxidaciones, así como modificaciones por diferentes agentes como GSH, NO, 4-Hidroxi-2-nonenal (HNE), etc. Estas modificaciones de la Cys298 modulan la actividad de la aldosa reductasa en diferentes situaciones (Petrash, 2004; Srivastava et al., 2005).

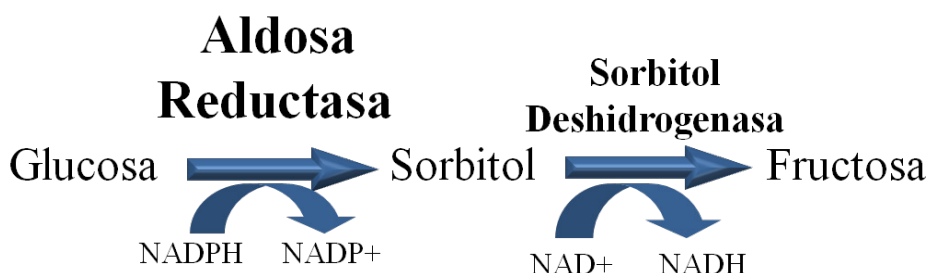
Dada la elevada similitud entre ellas, estas proteínas comparten especificidad por un amplio espectro de sustratos. Además, existe un gran número compuestos capaces de inhibir la actividad enzimática de ambas enzimas (Verma et al., 2008). Sin embargo, aunque la semejanza entre ambas proteínas es muy alta, sus patrones de expresión en el organismo humano son diferentes, así como sus funciones y sus implicaciones fisiopatológicas.

## **6.- LA ALDOSA REDUCTASA**

La aldosa reductasa o AKR1B1 (EC. 1.1.1.21) está presente en múltiples tejidos en el organismo. Los niveles más elevados se encuentran en la médula renal, córnea, cristalino, testículos, corazón y nervio ciático. Niveles más bajos se encuentran en hígado, pulmón, intestino delgado y colon (Cao et al., 1998). Esta enzima cataliza el primer paso del metabolismo de la glucosa en la ruta de los polioles, es decir, la reducción de glucosa a sorbitol, con la consiguiente oxidación de NADPH. El sorbitol es posteriormente oxidado a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa, con la consiguiente reducción de NAD<sup>+</sup> (Figura 6). En condiciones normales, menos del 3% de la glucosa es metabolizada a través de la ruta de los polioles. Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia el metabolismo de la glucosa por esta vía puede aumentar hasta suponer un 30 % (Petrash, 2004).

A pesar de los numerosos estudios realizados durante décadas, el papel fisiológico de la aldosa reductasa en el organismo no se conoce con exactitud. La aldosa reductasa fue descubierta en las vesículas seminales, y se le atribuyó un papel en la síntesis de fructosa para el aporte energético de los espermatozoides (Hers, 1956). Además, dados los elevados niveles de esta proteína en la médula renal, se cree que

podría estar implicada en la regulación de la presión osmótica en el riñón (Petrash, 2004).



**Figura 6.- Metabolismo de la glucosa a través de la vía de los polioles.** La aldosa reductasa cataliza la reducción de glucosa a sorbitol, con la consiguiente oxidación de NADPH. La sorbitol deshidrogenasa oxida el sorbitol a fructosa usando como cofactor  $\text{NAD}^+$ .

### 6.1.- La aldosa reductasa en las complicaciones diabéticas secundarias

Hacia 1959 van Heyningen y cols. describieron que un aumento en la actividad de la aldosa reductasa estaba relacionado con un aumento en la acumulación de sorbitol en el cristalino de ratas diabéticas (Van Heyningen, 1959). Poco tiempo más tarde, Kinoshita y cols., demostraron que la inhibición de la aldosa reductasa con sorbinil, disminuía la formación de cataratas en ratas diabéticas. A partir de éstas y otras observaciones se postuló lo que se denominó la hipótesis osmótica, que propone que la acumulación de sorbitol, sintetizado por la aldosa reductasa en diferentes tejidos en situaciones de hiperglucemia en el organismo, podría producir un estrés osmótico, con el consiguiente desequilibrio en el transporte de iones y una disminución en la síntesis de proteínas, lo que conduciría al desarrollo de complicaciones diabéticas secundarias como cataratas, nefropatía, retinopatía o neuropatía (Kinoshita et al., 1981). Posteriormente, se describió que el aumento del metabolismo de glucosa mediante la ruta de los polioles en situaciones de hiperglucemia, también puede generar un aumento en la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  en la célula, que finalmente puede producir una situación de estrés oxidativo-metabólico, lo que también contribuiría al desarrollo de las complicaciones diabéticas (Srivastava et al., 2005). Actualmente se dispone de numerosas evidencias experimentales que demuestran el papel de la aldosa reductasa en el desarrollo de complicaciones diabéticas secundarias, tanto *in vitro* como *in vivo*. (Ramana, 2011).

Debido a estas razones, la aldosa reductasa ha constituido una diana terapéutica clave en la búsqueda de inhibidores eficaces en la prevención y el tratamiento de las complicaciones diabéticas secundarias. Entre los inhibidores descritos se encuentran el sorbinil, tolrestat, epalrestat, zopolrestat, etc. Algunos como el sorbinil, han sido probados en ensayos clínicos, sin embargo ninguno de ellos ha llegado a comercializarse, a excepción del epalrestat, que actualmente se encuentra en uso clínico en Japón. En general, es debido al fracaso en los ensayos clínicos, ya que los inhibidores estudiados presentaron insuficiente penetración tisular, y sobretodo efectos secundarios, en algunos casos graves, como hepatitis o nefrotoxicidad. Una de las razones de la alta toxicidad, es que algunos de los inhibidores no son específicos de la aldosa reductasa, sino que también inhiben la actividad enzimática de otra AKR, la enzima aldehído reductasa (Srivastava et al., 1982).

Sin embargo, a pesar del desarrollo de diferentes inhibidores, aún no se conoce con exactitud cómo la inhibición de la aldosa reductasa previene el desarrollo de complicaciones diabéticas secundarias. Existe una cierta controversia en cuanto al papel del sorbitol en el desarrollo de estas patologías, ya que se ha descrito que los niveles acumulados de sorbitol en los tejidos en condiciones de hiperglucemia no son suficientemente elevados como para producir un estrés osmótico relevante (Ramana, 2011). Además, se demostró que tras el tratamiento con compuestos antioxidantes, se producía una disminución en la formación de cataratas en ratas diabéticas, mientras que los niveles de sorbitol permanecían elevados. Por lo tanto, se cree que existen otros mecanismos, aparte de los que se proponen en la hipótesis osmótica, que podrían explicar la implicación de la aldosa reductasa en las complicaciones diabéticas secundarias. Un aumento en el metabolismo de glucosa por la aldosa reductasa afecta a diferentes rutas metabólicas como glucólisis, glicosilación intracelular de proteínas, activación de la proteína quinasa C (PKC), estrés oxidativo, etc., que pueden contribuir también al desarrollo de las patologías en diabetes (Srivastava et al., 2005).

## **6.2.- La aldosa reductasa en la respuesta antioxidante**

Durante determinadas situaciones patológicas en el organismo como hiperglucemia, isquemia, infecciones, inflamación, etc. se produce un entorno de estrés oxidativo y un aumento en ROS. Esta situación puede provocar, entre otros procesos, peroxidación lipídica, es decir, la oxidación de ácidos grasos que forman parte de las

membranas biológicas, como el AA, produciendo aldehídos  $\alpha/\beta$  insaturados altamente reactivos. Estos compuestos pueden resultar muy perjudiciales para el organismo, ya que pueden generar daño en las proteínas celulares y en el DNA, o formar aductos con GSH. El producto de peroxidación lipídica más abundante es el HNE (Koenitzer and Freeman, 2010).

Mediante estudios estructurales se determinó que la aldosa reductasa tiene una afinidad muy baja por la glucosa, y que el sitio de unión al sustrato en el centro activo de la enzima posee una alta hidrofobicidad, algo que no es característico de enzimas que metabolizan glucosa, sino de enzimas que utilizan aldehídos hidrofóbicos como sustrato (Ramana, 2011). Hace algunos años se demostró que la aldosa reductasa tiene una elevada eficacia catalítica en la reducción de aldehídos reactivos procedentes de la peroxidación lipídica, principalmente HNE y sus conjugados con GSH, GS-HNE, a sus respectivos alcoholes, 1,4-dihidroxi-2-noneno (DHN) y GS-DHN. Se propuso que el HNE es el sustrato natural de la aldosa reductasa *in vivo*. Por lo tanto, esta enzima ejerce un papel protector en el organismo mediante el metabolismo de este tipo de aldehídos  $\alpha/\beta$  insaturados, participando así en la respuesta antioxidante (Srivastava et al., 1995).

Se ha observado que los niveles de la aldosa reductasa en algunos tejidos aumentan en condiciones asociadas con estrés oxidativo intenso como inflamación vascular, isquemia miocárdica o enfermedades hepáticas (Srivastava et al., 2005).

En un modelo de isquemia miocárdica en ratas, se demostró que se producía la oxidación del residuo de Cys298 presente en el centro activo a ácido sulfénico, dando lugar a la activación de la aldosa reductasa. Dicha oxidación era mediada por la presencia de NO y altos niveles de ROS generados bajo la situación de isquemia miocárdica. En este modelo se comprobó que la inhibición de la aldosa reductasa producía una acumulación de productos de peroxidación lipídica, como HNE, y un aumento en el tamaño del infarto de miocardio (Kaiserova et al., 2006; Kaiserova et al., 2008; Wetzelberger et al., 2010).

Sin embargo, también se han obtenido resultados contrarios respecto al papel de la aldosa reductasa en patologías cardiovasculares. En ratones transgénicos que expresaban niveles elevados de aldosa reductasa, el daño producido durante isquemia/reperfusión (I/R) miocárdica fue mucho mayor que en ratones normales. Asimismo, en estos animales la inhibición de la aldosa reductasa ejerció un efecto protector frente al daño producido por I/R (Ananthakrishnan et al., 2009; Hwang et al., 2004; Ramasamy and Goldberg, 2010).

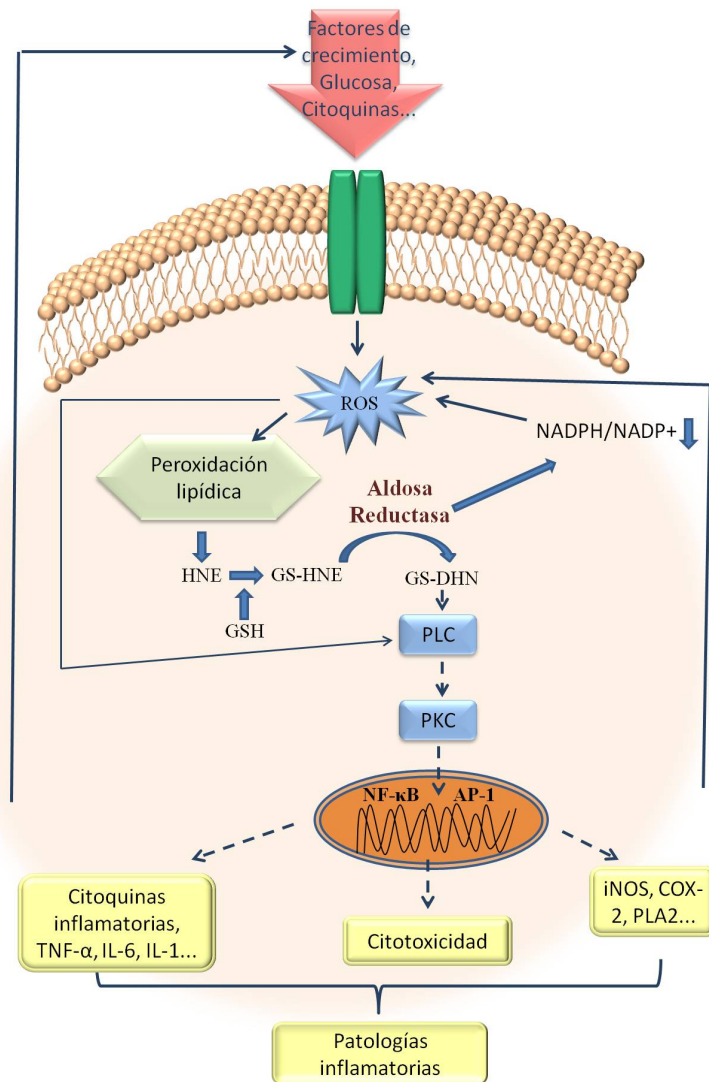


La controversia que existe en cuanto al papel de la aldosa reductasa en enfermedades cardiovasculares puede deberse a discrepancias en los modelos animales utilizados, los niveles de proteína, la actividad enzimática, etc. El correcto conocimiento del papel de esta enzima en el organismo requiere la unificación de los modelos animales utilizados, y que éstos se asemejen lo más posible a la fisiología humana.

### **6.3.- La aldosa reductasa en patologías inflamatorias**

El aumento de ROS en situaciones patológicas puede desencadenar también la activación de rutas de señalización inflamatorias y de respuesta a estrés oxidativo a través de la activación de enzimas como la fosfolipasa C (PLC) o la PKC. Estas enzimas a su vez activan cascadas de señalización de quinasas que activan factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1, los cuales inducen la transcripción de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas, etc., que de forma autocrina o paracrina van a amplificar la respuesta inflamatoria (Kansanen et al., 2012). Resultados obtenidos recientemente han demostrado que la actividad de la aldosa reductasa está asociada con el desarrollo de patologías inflamatorias (Figura 7). En modelos animales la inhibición de la aldosa reductasa previno el desarrollo de enfermedades como sepsis, asma, aterosclerosis o cáncer de colon (Ramana, 2011). La inhibición de la aldosa reductasa con sorbinil o tolrestat, inhibió la proliferación de células de músculo liso vascular y la apoptosis de células del endotelio vascular, de células epiteliales de cristalino humano y de macrófagos. Además, la inhibición de la aldosa reductasa disminuyó la activación de PKC y de NF- $\kappa$ B, la síntesis y activación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) estimulado por glucosa y la síntesis de mediadores inflamatorios como NO y PGE<sub>2</sub> (Ramana et al., 2007; Reddy et al., 2009).

La forma reducida del HNE conjugada con GS (GS-DHN) está implicada en la inducción de rutas de señalización de respuesta a estrés oxidativo a través de la activación de PLC por un mecanismo que se desconoce (Ramana, 2011). Una elevada producción de GS-DHN por la aldosa reductasa, puede contribuir también al desarrollo de patologías inflamatorias.



**Figura 7.- Implicación de la aldosa reductasa en patologías inflamatorias.** Estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, glucosa, etc. producen ROS en la célula. Esto provoca peroxidación lipídica, que da lugar a la formación de aldehídos reactivos, como HNE. Este compuesto puede conjugarse con GSH, generando GS-HNE. Estos conjugados son sustrato de la aldosa reductasa, dando lugar a GS-DHN, el cual se le considera un mediador inflamatorio, ya que puede dar lugar a la activación de cascadas de señalización inflamatorias a través de la activación de PLC. El metabolismo de la aldosa reductasa puede generar un desequilibrio en la proporción NADPH/NADP+, lo que también provoca la producción de ROS. Las ROS también activan por sí solas cascadas de señalización inflamatorias en la célula. (Adaptado de (Ramana and Srivastava, 2010)).

#### 6.4.- La aldosa reductasa en otras patologías

Se ha comprobado que la aldosa reductasa está presente en algunos tumores humanos. Inicialmente, se encontraron niveles elevados de aldosa reductasa en tumores de hígado (Cao et al., 1998). Posteriormente, se observó que la actividad y expresión de la aldosa reductasa también se encuentran elevadas en tumores de mama, ovario, cuello

uterino y recto (Saraswat et al., 2006). Recientemente se han obtenido diversos resultados tanto *in vitro* como *in vivo* que implican a la aldosa reductasa en el desarrollo de cáncer de colon (Tammali et al., 2011).

La diálisis peritoneal es un tratamiento de hemodiálisis alternativo para pacientes con insuficiencia renal. La presencia de altas concentraciones de glucosa y otros agentes hiperosmóticos en el medio de diálisis generan a largo plazo una serie de complicaciones en el peritoneo, que puede llevar a la pérdida de filtración de la membrana, fibrosis, y el fallo en la terapia. Se ha descrito que estas alteraciones podrían producirse debido a que las células mesoteliales del peritoneo sufren una transición epitelio mesenquimal (TEM), que podría estar inducida, entre otros factores, por el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Aguilera et al., 2005; Yanez-Mo et al., 2003). Se han obtenido numerosas evidencias que sugieren que la aldosa reductasa podría estar implicada en la inducción de TEM en situaciones de elevados niveles de glucosa. Se han encontrado niveles elevados de aldosa reductasa en pacientes a los que se les había aplicado diálisis peritoneal (Hasuike et al., 2007). La administración de un inhibidor de la aldosa reductasa disminuyó el desarrollo de fibrosis en ratas que estaban recibiendo un tratamiento de diálisis peritoneal (van Westrhenen et al., 2005). La presencia de la aldosa reductasa indujo TEM y otras alteraciones en la proliferación de células de cristalino en ratones, cambios que se asocian con el desarrollo de cataratas en diabetes (Zablocki et al., 2011). Además, la inhibición de la aldosa reductasa en células mesangiales produjo una disminución en la síntesis de TGF- $\beta$  inducido por glucosa (Ishii et al., 1998).

Por otro lado, se ha descrito que la aldosa reductasa podría estar también implicada en el desarrollo de aterosclerosis en situaciones de diabetes (Vedantham et al., 2011).

En conjunto, estas evidencias revelan el importante papel que la aldosa reductasa ejerce en el desarrollo de diversas patologías, por lo que constituye una diana terapéutica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, debido a la variedad de procesos en los que puede estar implicada la aldosa reductasa en el organismo, su inhibición puede generar efectos beneficiosos o perjudiciales, que dependerán del contexto biológico y/o la situación patológica.

### **6.5.- Regulación de la expresión de la aldosa reductasa**

Los niveles de la aldosa reductasa aumentan en determinadas situaciones tanto fisiológicas como patológicas y en presencia de diferentes agentes como glucosa, factores de crecimiento, oxidantes, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , etc. Sin embargo, poco se conoce sobre el mecanismo que regula la expresión de esta proteína. Inicialmente se identificó en el promotor de la aldosa reductasa un elemento de respuesta osmótica (ORE), que parece que está implicado en la regulación de la expresión de esta enzima durante la osmorregulación renal (Ruepp et al., 1996). Posteriormente, se ha descrito que TNF- $\alpha$  induce la expresión de la aldosa reductasa mediada por la unión de NF- $\kappa$ B a la secuencia ORE del promotor (Iwata et al., 1999). Además, se ha observado que la activación de PKC por un agente tumoral induce la expresión de la aldosa reductasa en células Hela a través de la activación de NF- $\kappa$ B (Lee et al., 2005). En células de músculo liso vascular se ha observado que la inducción de la expresión de la aldosa reductasa por estrés oxidativo está regulada por la vía de señalización de la quinasa p38 y la vía del receptor del factor de crecimiento epitelial y la quinasa regulada por señal extracelular (EGFR-ERK) (Yabe-Nishimura et al., 2003). Recientemente, se ha observado que TGF- $\beta$  induce la expresión de la aldosa reductasa en células mesangiales renales mediante la inducción de estrés oxidativo y la activación de Nrf2, el cual se une a elementos de respuesta antioxidante (ARE) presentes en el promotor de la aldosa reductasa (Wang et al., 2012). Dado que parece que la aldosa reductasa está implicada a la vez en la activación de PKC, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  o TGF- $\beta$ , es posible que exista un mecanismo de autorregulación de estas vías que amplifique la respuesta inflamatoria y/u oxidativa en ciertas situaciones patológicas.

### **7.- La AKR1B10**

La proteína AKR1B10 está principalmente presente en colon e intestino delgado, por lo que también se la denomina reductasa del intestino delgado (human small intestine reductase). Además, puede aparecer en otros tejidos en menor proporción como en glándula adrenal, hígado, timo, próstata y testículos (Cao et al., 1998).

Fisiológicamente, se ha descrito que la proteína AKR1B10 podría ejercer un papel protector en el organismo, mediante su participación en procesos de detoxificación de aldehídos reactivos producidos durante la peroxidación lipídica en situaciones de estrés oxidativo, la síntesis de hormonas esteroideas o la digestión de

diferentes tipos de alimentos, ya que tiene la capacidad de catalizar la reducción de compuestos como 4-metilpirazol (4-MP), HNE, acroleína o crotonaldehído, además de algunos de sus conjugados con GSH (Martin and Maser, 2009; Shen et al., 2011; Zhong et al., 2009; Zu et al., 2007).

### **7.1.- La AKR1B10 en cáncer**

La AKR1B10 fue identificada hacia 1998 como una proteína muy abundante en cáncer de hígado humano, y fue inicialmente denominada “aldose reductase-like gene” (Zu et al., 2007) o HARP (Hepatoma specific Aldose Reductase-Related Protein), debido al elevado grado de identidad de secuencia con la aldosa reductasa (Cao et al., 1998; Scuric et al., 1998). Posteriormente, se han encontrado niveles de expresión elevados de esta proteína en otros tipos de tumores humanos o patologías relacionadas como en la enfermedad de reflujo erosiva y enfermedad de epitelio de Barret (Breton et al., 2008) y en cáncer de endometrio y cuello uterino. En este último, la expresión de la AKR1B10 se ha asociado con recurrencia después de la cirugía (Yoshitake et al., 2007). Sin embargo, numerosas evidencias asocian la presencia de la AKR1B10 principalmente con patologías relacionadas con el consumo de tabaco. Así, se han encontrado niveles de expresión de la AKR1B10 muy elevados en carcinoma de células escamosas (SCC) de pulmón, esófago y faringe, en adenocarcinoma de pulmón (Fukumoto et al., 2005) y de páncreas (Chung et al., 2012) y en epitelio aéreo de pulmón (Wang et al., 2010), en todos los casos en individuos fumadores. Por ello, se ha definido a esta proteína como un potencial marcador tumoral de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en fumadores (Fukumoto et al., 2005). Las conexiones entre la proteína AKR1B10 y las patologías relacionadas con el tabaco son muy amplias. Se ha observado que la expresión de la AKR1B10 se induce en células de epitelio de pulmón *in vitro* en presencia de extracto del humo de cigarrillo (Wang et al., 2010). Asimismo, el silenciamiento del gen de la AKR1B10 en numerosos tipos de líneas celulares tumorales da lugar a una disminución de la supervivencia celular y un aumento de la muerte por apoptosis (Chung et al., 2012; Ma et al., 2008; Satow et al., 2010; Yan et al., 2007). A su vez, la AKR1B10 al igual que otras AKR, puede producir la activación metabólica de los PAH. Estos compuestos pertenecen a una importante clase de carcinógenos que están presentes en el humo del tabaco y que tras su activación son altamente reactivos y producen un aumento de ROS, que posteriormente puede

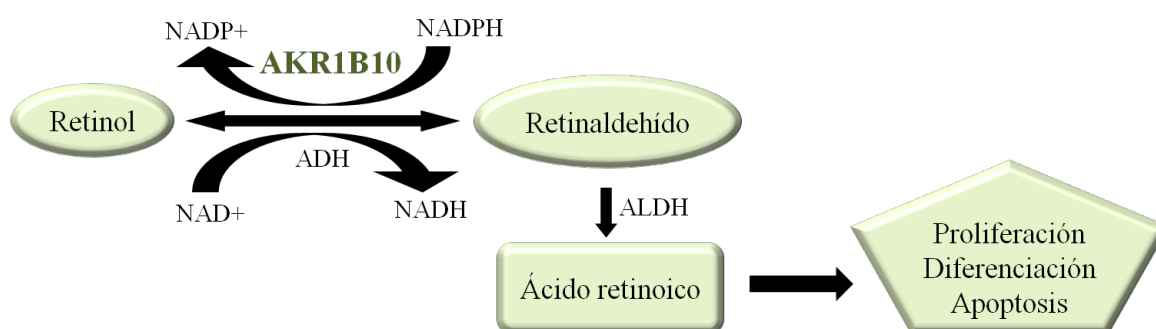
producir daño oxidativo en el DNA, y contribuir a la carcinogénesis en pulmón (Quinn et al., 2008).

La AKR1B10 puede contribuir al desarrollo de tumores por otros mecanismos, que incluyen su implicación en la vía de síntesis del ácido retinoico o en la vía de síntesis de los ácidos grasos, entre otros.

### 7.1.1.- La AKR1B10 en la ruta de síntesis del ácido retinoico

Los retinoides son compuestos tanto naturales como sintéticos, estructuralmente relacionados con la vitamina A, que están implicados en procesos de señalización, proliferación y diferenciación celular, así como en la visión. Se ha demostrado que los retinoides modulan el crecimiento y la proliferación de las células tumorales en muchos sistemas experimentales. Además, se ha comprobado que el metabolismo y la señalización de los retinoides están disminuidos en tumores. Por ello, los retinoides se utilizan tanto en la prevención como en el tratamiento de patologías tumorales, por ejemplo de mama u ovario (Tang and Gudas, 2011).

El retinol (vitamina A) procedente de la dieta, da lugar a la formación del ácido retinoico (RA) mediante una reacción secuencial en dos pasos, en la que el paso limitante es la oxidación del retinol a retinaldehído catalizado por retinol deshidrogenasas (Figura 8). El RA es una molécula biológicamente activa, que a través de receptores nucleares principalmente de tipo RAR/RXR, regula numerosas funciones celulares como diferenciación, proliferación, apoptosis, etc. (Blomhoff and Blomhoff, 2006).



**Figura 8.- Ruta de biosíntesis del ácido retinoico.** La enzima AKR1B10 reduce el retinaldehído a retinol, interfiriendo así en la biosíntesis del ácido retinoico.

La proteína AKR1B10 es una enzima todo-*trans*-retinaldehído reductasa, ya que cataliza la reducción de retinaldehído a retinol, es decir, la reacción inversa del paso limitante de la síntesis del RA, con una eficacia catalítica mucho mayor que otras AKR *in vitro* (Crosas et al., 2003; Gallego et al., 2006; Yamada, 2002). Además, la proteína AKR1B10 expresada en varias líneas celulares también muestra una elevada actividad retinaldehído reductasa, que provoca una disminución de los niveles de RA intracelulares y una disminución de la activación de sus receptores, lo que podría conducir a la pérdida de la diferenciación celular y a la aceleración del crecimiento tumoral (Gallego et al., 2007; Ruiz et al., 2009; Wang et al., 2010).

#### **7.1.2.- La AKR1B10 en la ruta síntesis de los ácidos grasos**

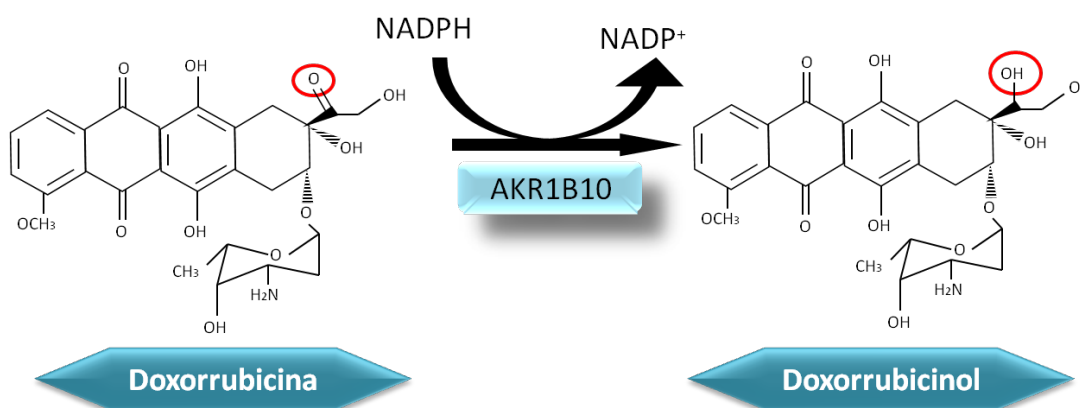
Los ácidos grasos de cadena larga son los principales constituyentes de las membranas biológicas, además de ser precursores de segundos mensajeros lipídicos que participan en diferentes vías de señalización. La acetil-CoA carboxilasa (ACCA) es una enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis *de novo* de los ácidos grasos de cadena larga. En una reacción dependiente de ATP, produce la carboxilación del acetil-CoA, dando lugar a la formación del malonil-CoA. Se ha descrito que el proceso de síntesis de los ácidos grasos aumenta en células cancerosas. Además, se han encontrado niveles muy elevados de enzimas lipogénicas como la ACCA, en diferentes tipos de tumores.

Se ha comprobado que la proteína AKR1B10 puede regular la síntesis *de novo* de los ácidos grasos en la célula a través de la interacción proteína-proteína con la enzima ACCA. Ésta interacción impide la ubiquitinación y posterior degradación de la ACCA mediante la vía del proteasoma. Estas observaciones se han asociado con un aumento en el crecimiento y la supervivencia celular en varias líneas celulares tumorales (Ma et al., 2008; Wang et al., 2009).

#### **7.1.3.- La AKR1B10 en quimiorresistencia**

La DOX y la daunorrubicina (DAN) son antibióticos que pertenecen al grupo de las antraciclinas, y son ampliamente utilizados desde hace décadas en terapias antitumorales para el tratamiento de leucemias, linfomas, tumores de mama, ovario, pulmón, etc. Estos compuestos ejercen efectos antiproliferativos y citotóxicos mediante diferentes mecanismos, aunque el más conocido es a través de su interacción con la

enzima topoisomerasa-II (top-II). Esta enzima tiene la función de regular la topología del DNA durante los procesos de replicación y transcripción celular, mediante la formación de un complejo top-DNA y la producción de roturas transitorias en la doble hélice de DNA. DOX y DAN se unen al complejo top-DNA, y lo estabilizan, lo que da lugar a un aumento y acumulación de roturas en la doble hélice de DNA, que resulta citotóxico para la célula (Gewirtz, 1999; Kellner et al., 2002).



**Figura 9.- Metabolismo de la doxorrubicina.** La enzima AKR1B10 cataliza la reducción de la doxorrubicina a doxorrubicinol, el cual tiene menos actividad antitumoral.

Se ha descrito que la enzima AKR1B10 puede metabolizar DOX y DAN a sus correspondientes alcoholes, DOX-OL y DAN-OL, los cuales son menos activos frente a la top-II y además, más susceptibles de ser exportados al exterior celular mediante mecanismos de detoxificación (Figura 9). Por lo tanto, los niveles elevados de la AKR1B10 en determinados tumores pueden contribuir a la disminución de la eficacia de terapias antitumorales en las que se utiliza DOX o DAN, lo que implica el desarrollo de quimiorresistencia (Balendiran, 2009; Martin et al., 2006).

## 7.2.- Inhibición de la AKR1B10 en el tratamiento de tumores

La elevada importancia de la AKR1B10 en carcinogénesis así como en quimiorresistencia, ha conducido a que esta proteína sea una diana muy estudiada en cuanto al desarrollo de inhibidores para su uso como fármacos antitumorales.

Debido a la gran homología de secuencia compartida con la aldosa reductasa, inhibidores específicos de esta enzima inhiben también la actividad enzimática de la



AKR1B10. Compuestos como sorbinil, tolrestat, zopolrestat o fibratos, son inhibidores comunes de la aldosa reductasa y la AKR1B10 (Balendiran, 2009; Verma et al., 2008). Otros inhibidores de la AKR1B10 descritos recientemente son por ejemplo, derivados de la curcumina como la bisdesmetoxicurcumina (Matsunaga et al., 2009), hormonas esteroideas y ácidos biliares (Endo et al., 2009), cyPG como la PGA<sub>1</sub> (Díez-Dacal et al., 2011), algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) como diclofenaco, ácido mefenámico y ácido glicirrético (Endo et al., 2010b), derivados de cromeno-3-carboxiamida (Endo et al., 2010a), etc. Sin embargo, todos estos compuestos inhiben también la actividad enzimática de la aldosa reductasa. No obstante, recientemente se ha descrito que compuestos naturales derivados del ácido cinámico, como el ácido cafeico 2-fenetil éster (CAPE) (Soda et al., 2012) y ácidos triterpénicos, como el ácido oleanólico (Takemura et al., 2011), son potentes inhibidores selectivos de la AKR1B10 frente a la AKR1B1.

### **7.3.- Regulación de la expresión de la AKR1B10**

Los mecanismos que regulan la expresión de la proteína AKR1B10 no se conocen con exactitud. En el promotor del gen de la AKR1B10 existen sitios de unión a los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B, además de ARE, donde se une el factor de transcripción de respuesta a estrés, Nrf2 (Liu et al., 2009). Últimamente, se han obtenido evidencias que apuntan a que Nrf2 podría ser uno de los principales reguladores de la expresión de la AKR1B10 (MacLeod et al., 2009; Nishinaka et al., 2011). Por otro lado, se ha descrito que la expresión de la proteína AKR1B10 en tumor hepático está regulada por EGF e insulina, a través de la ruta de señalización de AP-1 (Liu et al., 2012).

## **Objetivos**



Las cyPG son mediadores lipídicos altamente reactivos con propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y antivirales. Dada su alta reactividad, estos compuestos ejercen sus efectos biológicos principalmente por la modificación covalente de dianas celulares, mediante la adición de Michael. La identificación y caracterización de las dianas celulares de las cyPG tiene una elevada importancia, pues ayuda a conocer y comprender los mecanismos de acción de estos mediadores. En nuestro grupo de investigación se han identificado un gran número de dianas celulares de las cyPG, mediante el uso de abordajes proteómicos. En concreto, recientemente se han identificado dos proteínas de la superfamilia de las AKR como dianas selectivas de la  $\text{PGA}_1$ : la aldosa reductasa o AKR1B1 y la AKR1B10. Debido al relevante papel de estas proteínas en la fisiopatología humana, nos propusimos los siguientes objetivos:

1.- Caracterización de la interacción de la  $\text{PGA}_1$  con la proteína AKR1B1:

1.1.- Estudio de la modificación de la proteína recombinante AKR1B1 por  $\text{PGA}_1$ .

1.2.- Estudio de la repercusión funcional de la modificación de AKR1B1 por  $\text{PGA}_1$ .

1.3.- Estudio de los requerimientos estructurales de la modificación e inhibición de la AKR1B1.

2.- Caracterización de la interacción de  $\text{PGA}_1$  con la proteína AKR1B10:

2.1.- Estudio de la modificación de la proteína AKR1B10 por  $\text{PGA}_1$  *in vitro* y en células. Estudio de los residuos implicados en la modificación.

2.2.- Estudio de la repercusión funcional de la modificación de la proteína AKR1B10 por  $\text{PGA}_1$ .

2.4.- Estudio de la modificación e inhibición de la AKR1B10 por  $\text{PGA}_1$  en un modelo celular de adenocarcinoma de pulmón humano.

3.- Estudio de los efectos de la  $\text{PGA}_1$  en la biología tumoral de células de adenocarcinoma de pulmón.



## **Material y Métodos**



## **1.- MATERIAL**

### **1.1.- Material de cultivos celulares**

Los medios de cultivo DMEM, RPMI 1460, el medio de transfección Optimem, la Lipofectamina, los antibióticos penicilina/estreptomicina y gentamicina y la tripsina-EDTA fueron suministrados por Invitrogen. El suero de ternera fetal (FBS) fue suministrado por Lonza y PAA Laboratories. El material de plástico fue adquirido de Falcon (Becton Dickinson). Las placas de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio fueron suministradas por Mat Tek Corporation.

### **1.2.- Lípidos electrófilos**

La prostaglandina A<sub>1</sub>, (PGA<sub>1</sub>, ácido (13E,15S) 15-hidroxi-9-oxo-prosta-10,13-dien-1-oico) y su análogo biotinilado (PGA<sub>1</sub>-B, N-9-oxo-15S-hidroxi-prosta-10,13E-1-dien-1-oil-N-biotinoil-1,5-diaminohexano), así como los demás lípidos electrófilos utilizados fueron suministrados por Cayman Chemical.

### **1.3.- Anticuerpos**

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-AU5 (Berkeley Antibody Company, Babco), anti-actina (Sigma), anti-aldosa reductasa (anti-AKR; Santa Cruz Biotechnology), anti-AKR1B10 (Origene). Los anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas de conejo o ratón acoplados a peroxidasa fueron obtenidos de Dako Cytomation, mientras que el anticuerpo secundario frente a inmunoglobulina de cabra fue suministrado por BioRad. La estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano (HRP-estreptavidina) procedió de Amersham (GE Biosciences).

### **1.4.- Reactivos de electroforesis**

La acrilamida, N,N'-metilén-bis-acrilamida, el persulfato amónico (APS), la N,N,N',N'-tetrametilendiamida (TEMED), el dodecilsulfato sódico (SDS), la glicina y el Tris con el grado de pureza apto para electroforesis fueron suministrados por BioRad y poseían el grado de pureza apto para electroforesis.



### 1.5.- Otros reactivos

Las cuantificaciones de proteína se llevaron a cabo mediante el método “BCA Assay” (Pierce). El agua empleada fue de grado reactivo Milli Q (Millipore). El dimetilsulfóxido (DMSO), el DL-gliceraldehído, la sal tetrasódica de  $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), la DL-butionina-(S,R)-sulfoximina (BSO), la DOX y el fenofibrato, procedieron de Sigma. La resina de neutravidina agarosa utilizada en la purificación de proteínas biotiniladas procedió de Pierce y Thermo Scientific. El sustrato quimioluminiscente (ECL) procedió de Amersham (GE Biosciences). El AD-5467 procedió de WAKO. El ditioneitol (DTT) procedió de Invitrogen.

## 2.- MÉTODOS

### 2.1.- Cultivos celulares

Los fibroblastos de ratón, NIH-3T3, las células epiteliales de riñón de mono, COS-7 y las células de carcinoma de pulmón humano de células no pequeñas, H1299 procedieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y Calu-3 fueron cedidas por los Drs. F. Rodríguez Pascual y A. Silva respectivamente. Las células de riñón humano HEK 293T fueron cedidas por la Dra. García Bermejo.

Las células NIH-3T3, COS-7, HEK 293T y Calu-3 fueron cultivadas en medio DMEM, con FBS al 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100  $\mu$ g/ml. Las células H1299 fueron cultivadas en medio RPMI 1460 con FBS al 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100  $\mu$ g/ml. Las células A549 fueron cultivadas en medio RPMI 1460 con FBS al 10%, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50  $\mu$ g/ml y gentamicina 50  $\mu$ g/ml. Los pases de estas células adherentes se realizaron siguiendo un protocolo de tripsinización, lavado con medio completo, centrifugación y resuspensión en medio fresco. Se mantuvieron en cultivo en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C.

## 2.2.- Mutagénesis

### *Vectores de expresión de la AKR1B10*

Los vectores de expresión que codifican la proteína AKR1B10 silvestre (WT) fusionada con la secuencia AU5, pCEFL-AU5-AKR1B10-WT y el mutante en el residuo de cisteína 298, **pCEFL-AU5-AKR1B10-Cys298Ser**, fueron generados previamente en el laboratorio (Gayarre, 2007).

Los vectores de expresión que codifican las proteínas AKR1B10 mutadas en los residuos Tyr49 o His111, **pCEFL-AU5-AKR1B10-Tyr49Phe** y **pCEFL-AU5-AKR1B10-His111Ala** respectivamente, se generaron utilizando el *Site Directed Mutagenesis Kit II* (Stratagene), a partir del plásmido pCEFL-AU5-AKR1B10-WT utilizando los siguientes oligonucleótidos con sus correspondientes complementarios:

5'-CTGTGCCTATGTCTTTCAGAATGAACATGAAGTGGG-3'

(Tyr49Phe, sentido)

5'-GGACGTCTATCTTATTGCCTGGCCACAGGGATTCAAGTCTGG-3'

(His111Ala, sentido)

Los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis se sintetizaron de manera automática en un sintetizador Oligo 1000M (Beckman) o en el sintetizador Applied Biosystems 3400 y se purificaron en columnas de Sefadex G25, NAPTM suministradas por Amersham, en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC).

Todas las enzimas de restricción utilizadas procedieron de Promega.

Las extracciones de DNA plasmídico transformado en bacterias competentes a pequeña escala se llevaron a cabo empleando el “*High Pure Plasmid Isolation Kit*” (Roche). Para la obtención de DNA a gran escala libre de endotoxinas, se empleó el Kit “*EndoFree Plasmid Maxi Kit*” (Qiagen). La cuantificación de DNA se realizó en un Nanodrop (Bio-Rad).

Los productos de PCR y de digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/vol) y 5 ng/ml de bromuro de etidio (Sigma) en tampón TAE (40 mM

Tris-acetato, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8), y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación llevada a cabo por SECUGEN S.A (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC).

### **2.3.- Transfecciones**

Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente cuando llegaron a un 80% de confluencia. Se utilizó el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. En general, se utilizaron 3 µl de reactivo por 1 µg de DNA. Tras 4 horas de transfección, las células se cultivaron durante 24 horas en medio de cultivo completo antes de realizar los tratamientos.

### **2.4.- Tratamientos de las células en cultivo**

Los tratamientos se realizaron en medio sin suero, excepto cuando se indica, durante los tiempos y concentraciones indicadas en cada caso. Las prostaglandinas, el AD-5467, la doxorubicina y el fenofibrato se añadieron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), y los controles recibieron un volumen equivalente de dicho vehículo. La concentración de DMSO no superó el 0.6 % (v/v) en el medio de cultivo durante los tratamientos, a la cual no se observaron efectos en la viabilidad celular. Los tratamientos se realizaron cuando las células se encontraban a un 80-90% de confluencia en el caso de las células COS-7, y a un 60-70 % de confluencia en el caso de las células A549, H1299 y Calu-3.

### **2.5.- Obtención de lisados celulares**

La obtención de los lisados celulares se realizó en tampón de lisis que contenía 10 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM β-mercaptoetanol, 320 µg/ml Pefablock (Roche), 0,1 mM ortovanadato sódico, 50 mM fluoruro de sodio, inhibidores de proteasas (leupeptina, aprotinina e inhibidor de tripsina a 2 µg/ml cada uno) y detergente NP-40 (Sigma) a una concentración final del 1%. La lisis celular se llevó a cabo mediante pases forzados a través de agujas de 26½ G (Becton Dickinson). Los lisados se centrifugaron a 17000 x g durante 10 min., y finalmente se recogió el sobrenadante para su posterior análisis.

## **2.6.- Extracción de la fracción celular soluble (S100)**

Las células se lisaron en tampón compuesto por 50 mM tampón fosfato pH 6.8, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 320  $\mu$ g/ml Pefablock, 0,1 mM ortovanadato sódico, 50 mM NaF, e inhibidores de proteasas (leupeptina, aprotinina e inhibidor de tripsina a 2  $\mu$ g/ml cada uno). La lisis celular se llevó a cabo mediante pases forzados a través de agujas de 26½ G. El lisado fue sometido a ultracentrifugación a 200000 x g durante 30 min. a 4°C en un rotor Beckman TLA 100. El sobrenadante resultante, la fracción celular soluble (S100), se recogió para su posterior análisis.

## **2.7.- Electroforesis y Western blot**

Para la detección y análisis de las proteínas presentes en los diferentes tipos celulares, el lisado celular o las fracciones S100 obtenidas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) del 12,5%. Previamente a la electroforesis, las muestras se incubaron 5 min. a 95°C en presencia de tampón Laemmli (80 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, y azul de bromofenol). Posteriormente a la electroforesis, las proteínas se transfirieron por método semiseco (BioRad) a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) y a continuación, dichas membranas se bloquearon con una solución de leche en polvo desnatada al 2% en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM pH 7,5 y Tween 20 al 0,05%). Posteriormente las membranas se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios con reconocimiento específico de las proteínas de interés y posteriormente con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, que reconocen específicamente inmunoglobulinas de ratón, conejo o cabra. En algunos casos las membranas fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa (HRP-estreptavidina), que reconoce específicamente biotina. Todos los anticuerpos se prepararon en diluciones 1:500-1:2000 en una solución de 1 % de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) en TTBS. Los inmunocomplejos y los complejos biotina-estreptavidina se detectaron por quimioluminiscencia con los reactivos ECL. Para el análisis de los niveles de las proteínas de interés, las señales obtenidas tras las exposiciones y el revelado en películas fotográficas (Afga) se cuantificaron utilizando un escáner (Agfa) acoplado al análisis informático de imagen mediante el programa “Scion Image” de Scion

Corporation. Los niveles de cada proteína de interés se corrigieron con respecto a los niveles de actina.

## **2.8.- Purificación de proteínas marcadas con PGA<sub>1</sub>-B mediante cromatografía en resina de neutravidina-agarosa**

Las células A549 fueron tratadas con PGA<sub>1</sub>-B a una concentración final de 60  $\mu$ M o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO) durante 24 horas. Posteriormente se obtuvieron las correspondientes fracciones S100 a las que después se les añadió SDS y NP-40 a una concentración final de 0,1% y 1% respectivamente, para reducir la unión inespecífica a la resina. Posteriormente 50  $\mu$ g de proteína total se incubaron con la resina de neutravidina agarosa durante 1 hora a 4°C con agitación constante. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante centrifugación de la mezcla de incubación a 2500 x g durante 2 min. y posteriores lavados de la resina con tampón de lisis con 1% NP-40 y 0,1% SDS. Las proteínas retenidas se eluyeron mediante incubación en tampón de Laemmli a 100°C durante 5 min. Las diferentes fracciones obtenidas fueron posteriormente sometidas a análisis mediante SDS-PAGE y Western Blot.

## **2.9.- Ensayos de actividad enzimática**

Los ensayos de actividad enzimática de la AKR1B10 se realizaron utilizando fracciones S100. Los de la actividad enzimática de AKR1B1 se realizaron utilizando la proteína recombinante (Amsbio, Prospect). En ambos casos, se utilizó DL-gliceraldehído como sustrato, y NADPH como cofactor. El ensayo de actividad se llevó a cabo a temperatura ambiente en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 6,8, y en presencia de 200  $\mu$ M NADPH y 10 mM DL-gliceraldehído en un volumen total de 850  $\mu$ l a 1 ml, dependiendo de cada experimento. Para comenzar el ensayo enzimático, se añadieron a la cubeta 50  $\mu$ g de proteína total de la fracción S100 en el caso de la proteína AKR1B10, o 2  $\mu$ g de proteína recombinante en el caso de AKR1B1. En los casos en los que la proteína AKR1B1 se preincubó con algún compuesto, se comenzó el ensayo añadiendo a la cubeta la mezcla de preincubación. A los 20 min del comienzo del ensayo, la actividad enzimática se monitorizó midiendo el consumo de NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{340\text{nm}, \text{NADPH}} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), en un espectrofotómetro Ultrospec 4300 pro (Amersham Biosciences). La actividad enzimática se expresó en unidades de

nmol/min/mg proteína. En las condiciones de ensayo la actividad enzimática fue proporcional al tiempo y la cantidad de proteína empleada.

### **2.10.- Análisis del ciclo y muerte celular**

Para el análisis de ciclo celular, las células fueron tratadas con  $\text{PGA}_1$  y/o DOX a las concentraciones indicadas durante 16 horas. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y fijadas con etanol al 70% un mínimo de 2 horas a 4°C. Inmediatamente antes del análisis en el citómetro, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 0.5% NP-40, 25  $\mu\text{g/ml}$  ioduro de propidio (IP) (Sigma) y 25  $\mu\text{g/ml}$  RNAsa (Sigma) en PBS y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se analizó el ciclo celular por citometría de flujo en un analizador EPICS Coulter.

Para el análisis de la muerte celular, las células fueron tratadas con  $\text{PGA}_1$  a las concentraciones y tiempos indicados. Posteriormente fueron tripsinizadas, lavadas en PBS y resuspendidas a una concentración de  $10^6$  células/ml en 50 mM HEPES, 700 mM NaCl y 12,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4 en presencia de Anexina V-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) y 5  $\mu\text{g/ml}$  de IP. Tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, la muerte celular se analizó mediante la cuantificación de la unión de Anexina V y la incorporación de ioduro de propidio a la célula por citometría de flujo.

### **2.11.- Detección de la acumulación intracelular de doxorrubicina**

Las células A549 se cultivaron en placas de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio. Después de los tratamientos con  $\text{PGA}_1$  y/o DOX a las concentraciones indicadas, se fijaron con 4% paraformaldehído y se tiñeron los núcleos con 14  $\mu\text{g/ml}$  de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). La acumulación intracelular de doxorrubicina se observó en un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS-SP5-AOBS, utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de la DOX, de 480 nm y 590 nm respectivamente.

La cuantificación de la acumulación de DOX se realizó mediante citometría de flujo en un analizador EPICS Coulter, usando las longitudes de onda de excitación y emisión de la DOX.

### **2.12.- Ensayo de crecimiento celular independiente de adhesión en agarosa**

Las células A549 fueron tratadas con  $\text{PGA}_1$  30  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Después del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas a 2000 células/ml en medio completo RPMI sin rojo fenol, que contenía 0,3% agarosa de bajo punto de fusión (LM) (Laboratorios Conda S.A.) Posteriormente se añadió dicha suspensión de células a placas de 60 mm de diámetro recubiertas con 3 ml de 0,6 % agarosa LM en medio completo RPMI sin rojo fenol previamente gelificada. Una vez solidificada la capa de agarosa superior, las placas se incubaron en atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  y a una temperatura de 37°C durante 3 semanas. Durante el período de incubación, las células fueron tratadas con  $\text{PGA}_1$  tres veces por semana.

Para la cuantificación de las colonias las células fueron teñidas con 0,05% de bromuro de etidio en 50% de etanol y observadas en un transiluminador de UV. La eficiencia clonogénica fue calculada como el porcentaje del número de colonias crecidas en cada placa con respecto a las de la placa control.

### **2.13.- Ensayo de migración celular**

Las células A549 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaron la confluencia, y a continuación se creó una “herida” en la monocapa de células con una punta de pipeta de 200  $\mu\text{l}$ . Posteriormente, las células fueron tratadas con  $\text{PGA}_1$  en medio completo a las concentraciones indicadas. El ancho de la “herida” fue medido en tres puntos en cada pocillo inmediatamente después de la adición del tratamiento, y a diferentes tiempos después del tratamiento. Los resultados se representaron como migración relativa, que fue calculada como el porcentaje de la distancia migrada en cada caso con respecto a la condición control.

### **2.14.- Ensayo de viabilidad/proliferación celular**

Para determinar la citotoxicidad de los diferentes compuestos con los que se trataron las células durante el desarrollo de este trabajo, se realizaron ensayos de viabilidad/proliferación celular utilizando dos reactivos diferentes, el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma) y el reactivo AlamarBlue (Abdserotec). Ambos ensayos se basan en la reducción de estos reactivos

debida a enzimas mitocondriales, citósolicas y microsomales, cuya actividad es indicativa de viabilidad celular.

El ensayo con MTT se basa en la reducción de la sal de tretazol a cristales de formazán insolubles en agua que se depositan en el interior celular. En este caso, las células se sembraron en placas de 12 pocillos. Después de los tratamientos correspondientes, se añadió 0,05 mg/ml de MTT en medio RPMI sin rojo fenol. Tras 1 horas a 37°C, se añadió 250 µl de isopropanol ácido (0,1 N de HCl en isopropanol) y se llevó a cabo una incubación de 10 min en hielo con objeto de disolver los cristales de formazán. Finalmente se midió la absorbancia de la solución obtenida a 540 nm y 620 nm en un espectrofotómetro. La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de la diferencia de absorbancia entre 540 y 620 nm en cada condición, con respecto al control.

El reactivo AlamarBlue posee el compuesto resazurina, un indicador de oxidación-reducción (REDOX), que se reduce al compuesto resorufina, el cual es fluorescente y de color rosa. En este ensayo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, y tras los correspondientes tratamientos, se añadió AlamarBlue (10% del volumen de medio) y se incubó 3 horas a 37°C. Posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm y 690 nm en un espectrofotómetro. La viabilidad celular se calculó según la siguiente fórmula:

$$A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \text{ para el pocillo problema} / A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \text{ para el control} \times 100$$

$$R_0: AO_{LW}/AO_{HW}$$

$A_{LW}$ : Absorbancia a 540 nm

$A_{HW}$ : Absorbancia a 620 nm

$AO_{LW}$ : Absorbancia de AlamarBlue oxidado a 540 nm

$AO_{HW}$ : Absorbancia de AlamarBlue oxidado a 620 nm

## 2.15.- Análisis de la modificación de AKR recombinantes por PGA<sub>1</sub>

Las proteínas AKR1B10 (Origene) y AKR1B1 recombinantes se incubaron en tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,45 mM NaCl, 5m M MgCl<sub>2</sub> y 0.1 mM DTT, en presencia de PGA<sub>1</sub> a las concentraciones que se indica en cada caso durante 2 horas a



temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron purificadas con columnas Zip Tip C4 (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante y finalmente analizadas por MS de tipo ionización/desorción mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) en el servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Los análisis fueron llevados a cabo en un espectrómetro de masas Autoflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics) equipado con un láser Smartbeam. La matriz utilizada fue 2,5-dihidroxi-acetofenona (Bruker-Daltonics). 2 µl de la muestra a analizar se diluyeron con 2 µl de ácido trifluoroacético al 2% (v/v) (Sigma-Aldrich) y 2 µl de disolución de la matriz. Un 1 µl de esta mezcla se depositó en el portamuestras del MALDI (placa de acero inoxidable MTP384 800 µm AnchorChip, Bruker-Daltonics) y se dejó cristalizar a temperatura ambiente.

En el caso de la AKR1B10, para el análisis de la huella peptídica, la proteína fue incubada en las condiciones anteriores, y posteriormente se llevó a cabo la digestión peptídica mediante la incubación con Tripsina (Promega) a una relación 1:20 (tripsina: proteína), durante 6 horas a 37°C. Finalmente, la digestión fue purificada en columnas Zip Tip C18, y analizada por MS mediante MALDI-TOF. Algunos péptidos de interés obtenidos fueron sometidos a fragmentación por MS/MS mediante MALDI-TOF/TOF para el análisis de su secuencia. Para ello se mezcló una alícuota (1 µl) del digerido triptico con una alícuota (1 µl) de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics) a 3 mg/ml en acetronitrilo (Scharlau) al 33% (v/v) y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). 1 µl de la mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado AnchorChip (Bruker-Daltonics) 800 µm y se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS y MALDI-MS/MS se obtuvieron de forma manual en un espectrómetro de masas MALDI Autoflex III MALDI-TOF-TOF equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS. El análisis de los datos de masas se llevó a cabo con el software FlexAnalysis (Bruker-Daltonics). Las predicciones de proteínas con una puntuación (“score”) mayor que 81 y  $p < 0,05$  fueron consideradas significativas.

## 2.16.- Análisis estadístico

Cada experimento descrito se llevó a cabo un mínimo de tres veces. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar estadístico. El análisis estadístico de los valores medios obtenidos en las diferentes condiciones experimentales se realizó mediante el *test t de Student*, para muestras pareadas o no pareadas según el caso, y con una

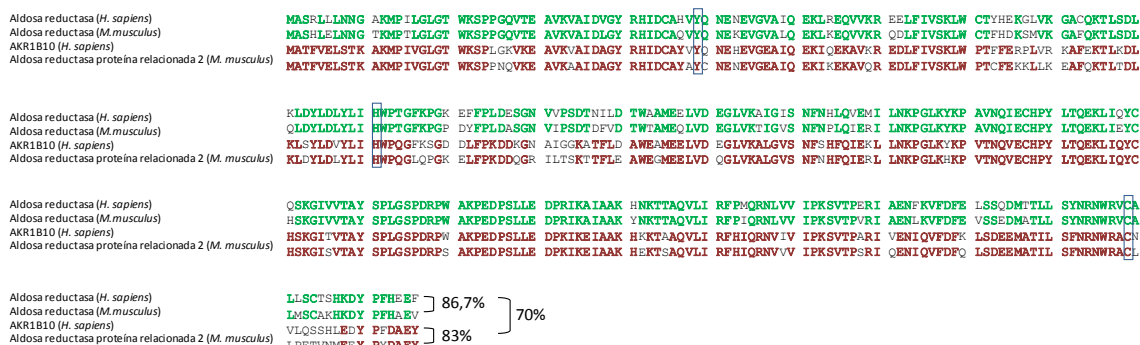
distribución de dos colas. El nivel de significación estadística se definió como  $p \leq 0,05$  ó  $p \leq 0,01$ , según se indica en cada caso.



## **Resultados**



El estudio de la selectividad de la modificación de proteínas por cyPG condujo a la identificación de las proteínas aldosa reductasa y AKR1B8 presentes en una línea celular de fibroblastos de ratón, NIH-3T3, como dianas selectivas de la PGA<sub>1</sub> (Figura 5). El interés de esta observación radica en la presencia en humanos de dos proteínas homólogas a éstas, la aldosa reductasa o AKR1B1 y la AKR1B10, respectivamente, con importantes implicaciones en fisiopatología. Como se observa en el alineamiento de las secuencias (Figura 10), las proteínas identificadas en fibroblastos de ratón comparten más de un 80% de identidad de secuencia con sus homólogas en humanos. Además, entre las dos proteínas humanas también existe un alto grado de identidad de secuencia.

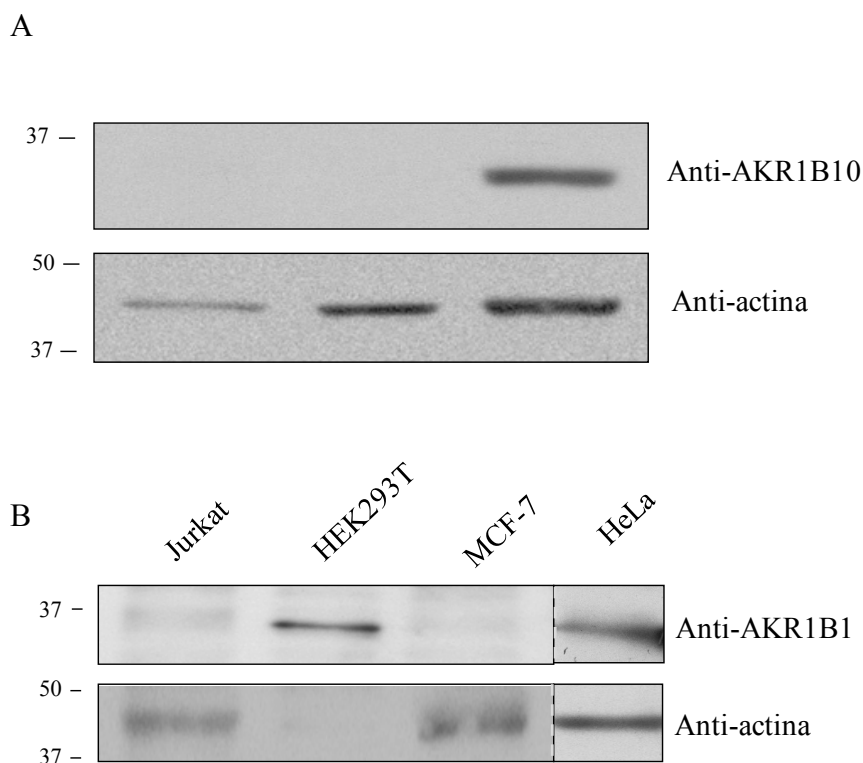


**Figura 10.- Alineamiento de las secuencias de proteínas murinas y humanas, pertenecientes a la superfamilia de las AKR.** En color verde se muestran las zonas de la secuencia que son idénticas en las aldosas reductasa humana y murina. En color rojo se muestran las zonas de las secuencias de la AKR1B10 y la AKR1B8 que son idénticas entre sí. Aparecen también señalados algunos residuos importantes que están conservados en estas proteínas.

Teniendo en cuenta estas observaciones, nos interesó comprobar si estas proteínas podrían ser también diana de PGA<sub>1</sub>-B en células humanas.

Para ello, en primer lugar se analizaron los lisados procedentes de varias líneas celulares humanas mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos específicos para AKR1B1 o AKR1B10 en cada caso, para identificar líneas celulares con altos niveles de cada una de las proteínas de interés, y por lo tanto, adecuadas como modelos experimentales para su estudio. En el caso de la AKR1B1, se analizaron las células Hela, HEK293T, MCF-7 y Jurkat. Como se observa en la figura 11A, en las líneas celulares Hela y HEK293T se detectaron los niveles más altos de la proteína AKR1B1,

en comparación con las otras líneas analizadas. Por otro lado, dado que se ha descrito que la AKR1B10 es un marcador tumoral en cáncer de pulmón (Fukumoto et al., 2005), se analizaron tres líneas celulares de cáncer de pulmón humano: Calu-3, H1299 y A549. Como se observa en la figura 11B, las células A549 mostraron altos niveles de AKR1B10, a diferencia de las otras líneas celulares, en las que no se detectó señal de la proteína.

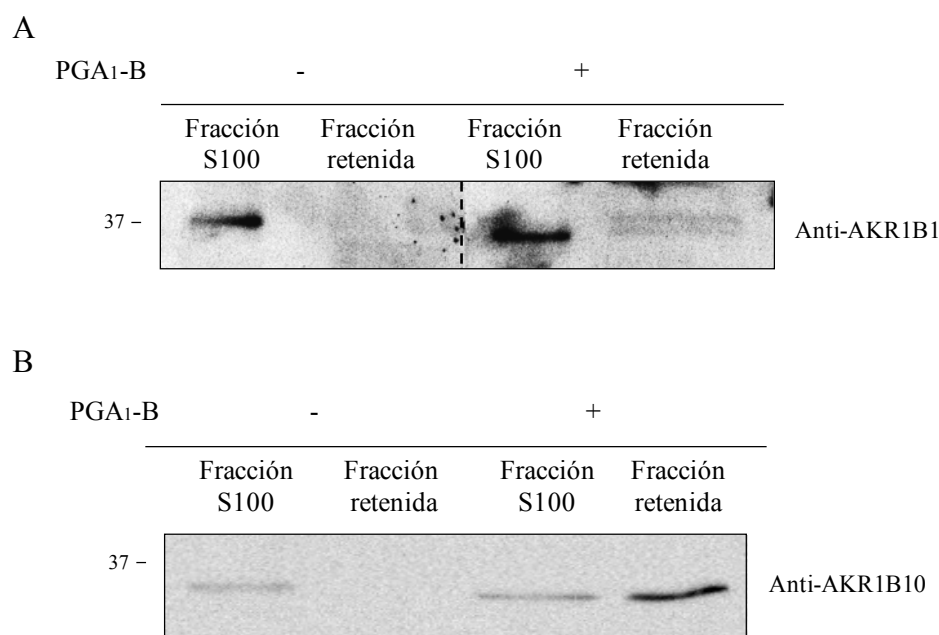


**Figura 11.- Análisis de los niveles de AKR1B1 y AKR1B10 en líneas celulares humanas.** Se obtuvieron los lisados de las células Jurkat, HEK293T, MCF-7 y HeLa (A); y Calu-3, H1299 y A549 (B), como se indica en el apartado de “Material y Métodos”. Se analizaron 15 µg (A) y 20 µg (B) de extracto proteico mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti-AKR1B1, anti-AKR1B10 y anti-actina. La posición de los marcadores de peso molecular se muestra a la izquierda.

Se escogieron las líneas celulares humanas HeLa y A549 para comprobar si las proteínas AKR1B1 y AKR1B10, respectivamente, podrían ser diana de modificación covalente por PGA<sub>1</sub>-B.

Se realizó una cromatografía en resina de neutravidina-agarosa con las fracciones S100 procedentes de las células HeLa y A549, tratadas previamente con

PGA<sub>1</sub>-B. Seguidamente, las fracciones obtenidas en la cromatografía se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos específicos para AKR1B1 o AKR1B10. En la figura 12 se puede observar que en ambos casos, en las fracciones retenidas procedentes de las células tratadas con PGA<sub>1</sub>-B, aparece señal específica de proteína que no aparece en las muestras procedentes de las células control. Este hecho es indicativo de que ambas proteínas, AKR1B1 y AKR1B10, quedan retenidas en la resina de neutravidina-agarosa, lo que sugiere que son modificadas por PGA<sub>1</sub>-B en las células Hela y A549, respectivamente.



**Figura 12.- Análisis de la modificación de proteínas AKR por PGA<sub>1</sub>-B.** Las células Hela (A) y A549 (B) fueron tratadas con 60  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>-B o vehículo (DMSO) durante 24 horas. Las fracciones S100 se obtuvieron como se indica en el apartado de “Material y Métodos”, y posteriormente fueron sometidas a cromatografía en neutravidina-agarosa. Las fracciones retenidas y una alícuota de las fracciones S100 fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti-AKR1B1 y anti-AKR1B10.

Las proteínas AKR1B1 y AKR1B10 tienen una elevada importancia fisiopatológica en humanos. Con las evidencias obtenidas en los resultados de la cromatografía en neutravidina-agarosa, se procedió a la confirmación y caracterización de la modificación de estas proteínas por PGA<sub>1</sub>.

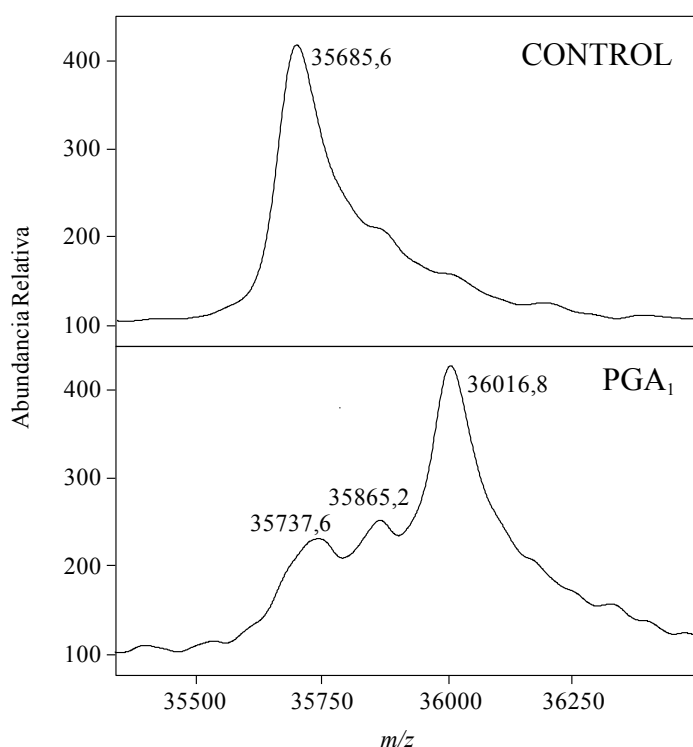


## 2.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B1 POR PGA<sub>1</sub>

### 2.1.- Estudio de la modificación de la proteína recombinante humana AKR1B1 por PGA<sub>1</sub> mediante MS

La unión de PGA<sub>1</sub> a la proteína AKR1B1 se analizó mediante MS por MALDI-TOF, utilizando proteína AKR1B1 recombinante humana.

En la figura 13 se muestran los espectros obtenidos con la proteína control y con la proteína incubada con PGA<sub>1</sub>.



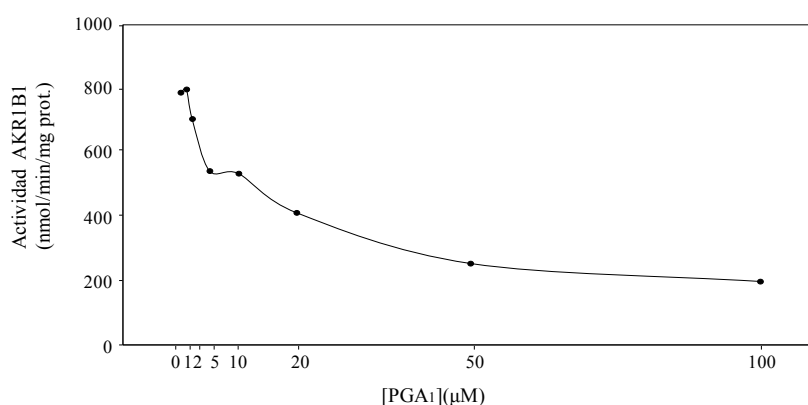
**Figura 13.- Análisis de la modificación de la proteína recombinante AKR1B1 mediante MS.** La proteína recombinante AKR1B1 (1 µg) fue incubada con vehículo (DMSO) ó 50 µM PGA<sub>1</sub>, durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente la mezcla de incubación fue analizada por MS mediante MALDI-TOF.

En el espectro obtenido con la proteína control, se observa un pico de  $m/z$  35685,6, compatible con la proteína AKR1B1 (Mm teórica 35707 Da). Por otro lado, en el espectro obtenido con la proteína incubada con PGA<sub>1</sub>, se observa un pico mayoritario de  $m/z$  36016,8. El incremento de  $m/z$  observado en este pico (+331,8) con respecto al pico observado en el espectro control, es compatible con la adición de una molécula de

PGA<sub>1</sub> (Mm teórica 336,5 kDa) a la proteína. El pico de  $m/z$  35737,6 podría corresponder a la proteína no modificada por la PG que hubiera sufrido alguna oxidación. El otro pico que aparece en el espectro de la proteína incubada con PGA<sub>1</sub>, de  $m/z$  35865,2, presenta un incremento que podría corresponder a una molécula de PGA<sub>1</sub> fragmentada o a la presencia de otras modificaciones que no han sido analizadas.

## 2.2.- Efecto de la PGA<sub>1</sub> sobre la actividad enzimática de AKR1B1

Los resultados anteriores indican que la PGA<sub>1</sub> se une a la proteína recombinante AKR1B1. A continuación se procedió al estudio de la repercusión funcional de dicha modificación. Para ello, se monitorizó la actividad enzimática de la AKR1B1 en presencia de concentraciones crecientes de PGA<sub>1</sub>. Como muestra la figura 14, la actividad de la proteína AKR1B1 disminuyó de forma dependiente de la concentración de PGA<sub>1</sub>. El valor de la constante IC<sub>50</sub> en estas condiciones resultó ser de 20,89  $\mu$ M.



**Figura 14.- Efecto de la PGA<sub>1</sub> sobre la actividad de la AKR1B1.** Se monitorizó la actividad enzimática de la proteína recombinante AKR1B1 en presencia de PGA<sub>1</sub> a las concentraciones indicadas en la figura. Los resultados son la media de 2 experimentos.

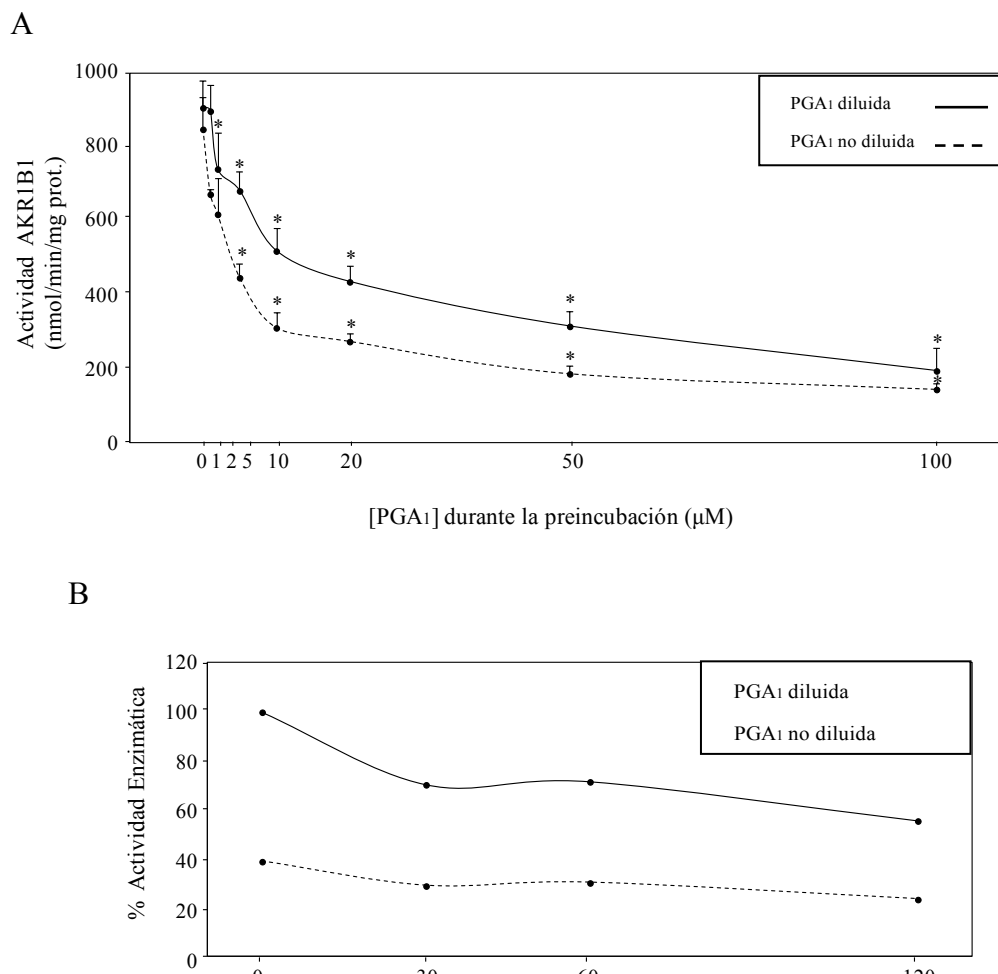
## 3.- CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE AKR1B1 POR PGA<sub>1</sub>

Tras determinar que la PGA<sub>1</sub> inhibe la actividad enzimática de la proteína AKR1B1, se procedió a la caracterización de la inhibición. Con objeto de explorar si la PGA<sub>1</sub> podía inactivar irreversiblemente la enzima, en primer lugar, se realizó un ensayo incubando la AKR1B1 con concentraciones crecientes de PGA<sub>1</sub>, durante 2 horas a temperatura ambiente, con el fin de reproducir las condiciones experimentales utilizadas

en el análisis por MS. Posteriormente, se monitorizó la actividad AKR1B1 en dos condiciones distintas: manteniendo la misma concentración de  $\text{PGA}_1$  que la utilizada durante la preincubación o diluyendo la  $\text{PGA}_1$  10 veces. Como se observa en la figura 15A, en ambas condiciones la actividad enzimática de AKR1B1 disminuyó de forma dependiente de la concentración de  $\text{PGA}_1$ . Sin embargo, cuando la concentración de  $\text{PGA}_1$  se mantuvo durante el ensayo, la inhibición que se produjo fue mayor que cuando la concentración de  $\text{PGA}_1$  se diluyó 10 veces. No obstante, en estas condiciones, la actividad de la enzima no se recuperó completamente, sino que una parte importante de la inhibición se mantuvo a pesar de la dilución de  $\text{PGA}_1$ . Los valores de las constantes  $\text{IC}_{50}$  obtenidos para cada condición fueron: tras la dilución de  $\text{PGA}_1$ : 16,98  $\mu\text{M}$ ; sin realizar dilución de la  $\text{PGA}_1$ : 6,16  $\mu\text{M}$ . En la tabla 2 aparecen reflejados los valores de actividad enzimática de la AKR1B1 obtenidos en cada una de las condiciones experimentales ensayadas.

A continuación, se exploró el efecto del tiempo de incubación de la proteína AKR1B1 con la PG en la inactivación de la enzima. Como se observa en la figura 15B, la actividad de AKR1B1 se redujo conforme aumentó el tiempo de incubación con la PG. Además, los resultados concuerdan con los obtenidos en el experimento anterior, ya que la inhibición de la enzima fue mayor cuando la concentración de la  $\text{PGA}_1$  se mantuvo constante en el ensayo con respecto a la utilizada durante la incubación. Sin embargo, el efecto del tiempo de preincubación sobre la inhibición de la enzima resultó más patente cuando la  $\text{PGA}_1$  se diluyó durante el ensayo de actividad.

Conjuntamente, estos resultados sugieren que en la inhibición de la actividad de AKR1B1 por  $\text{PGA}_1$  existe un componente irreversible, en el que la enzima es inactivada probablemente debido a la unión covalente de la PG a la proteína.



**Figura 15.- Caracterización de la inhibición de AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>.** La proteína recombinante AKR1B1 se incubó con PGA<sub>1</sub> a las concentraciones indicadas o con vehículo (DMSO) durante 2 horas a temperatura ambiente (A) o con 20 μM PGA<sub>1</sub> o vehículo (DMSO), durante los tiempos indicados, a temperatura ambiente (B). Posteriormente se monitorizó la actividad enzimática de AKR1B1 manteniendo la misma concentración de PGA<sub>1</sub> que durante la preincubación, o diluyendo 10 veces la concentración de PGA<sub>1</sub> con respecto a la preincubación. En B) se muestra el porcentaje de actividad con respecto al control para cada tiempo de preincubación. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos en A) y la media de dos experimentos en B). \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición control.

**Tabla 2.- Detalle del experimento llevado a cabo en la medida de la actividad de AKR1B1 en presencia de  $\text{PGA}_1$ .**

[ $\text{PGA}_1$ ] durante la preincubación ( $\mu\text{M}$ )	[ $\text{PGA}_1$ ] en el ensayo de actividad ( $\mu\text{M}$ )	Actividad AKR1B1 (nmol/min/mg prot.)	[ $\text{PGA}_1$ ] en el ensayo de actividad ( $\mu\text{M}$ ) (diluyendo la $\text{PGA}_1$ )	Actividad AKR1B1 (nmol/min/mg prot.) (diluyendo la $\text{PGA}_1$ )
0	0	848,17	0	906,39
1	1	672,51	0,1	897,35
2	2	618,31	0,2	740,77
5	5	446,67	0,5	681,55
10	10	311,16	1	518,94
20	20	274,02	2	435,63
50	50	186,70	5	315,18
100	100	144,54	10	194,73

#### 4.- CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE $\text{PGA}_1$ -B CON AKR1B1

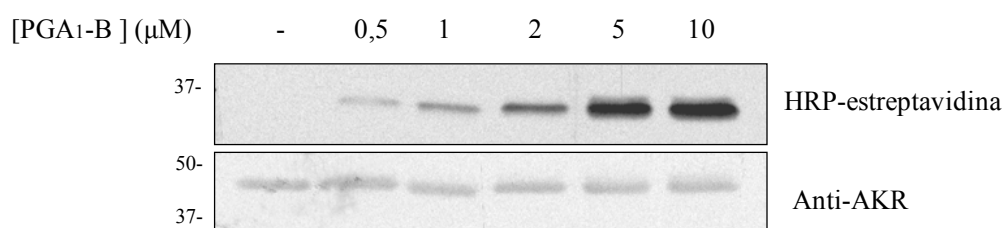
Los análogos biotinilados de las cyPG son una herramienta ampliamente utilizada en el estudio de la modificación de proteínas por estos lípidos electrófilos.

A continuación, se analizó la modificación e inhibición de la proteína AKR1B1 por el análogo biotinilado de  $\text{PGA}_1$ , con objeto de comprobar si ambas PG podrían tener efectos similares sobre esta proteína.

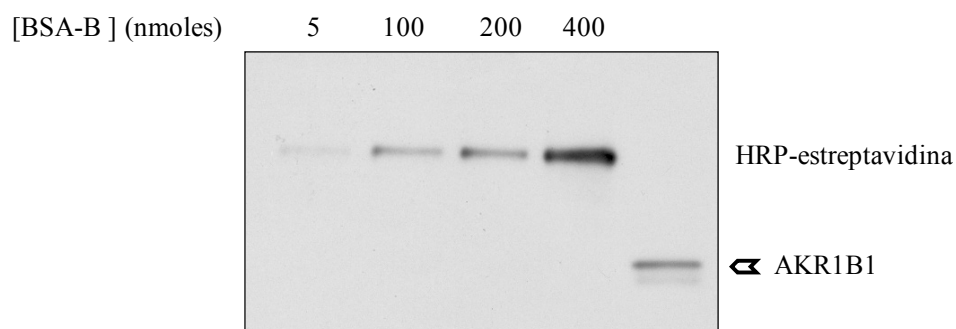
En primer lugar, se estudió la modificación de la proteína AKR1B1 por  $\text{PGA}_1$ -B mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina peroxidasa. Como se observa en la figura 16A, la  $\text{PGA}_1$ -B se une a la proteína AKR1B1 recombinante. Dicha unión es dependiente de la concentración de  $\text{PGA}_1$ -B.

Se realizó una semicuantificación de la unión de  $\text{PGA}_1$ -B a la proteína AKR1B1, utilizando BSA biotinilada (BSA-B) en una proporción conocida (Figura 16B). En estas condiciones experimentales, se produjo la incorporación de 1 mol de biotina por cada 10 moles de proteína AKR1B1. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se analizó la incorporación de  $\text{PGA}_1$ -B a la proteína en ausencia de agentes reductores (resultados no mostrados).

A



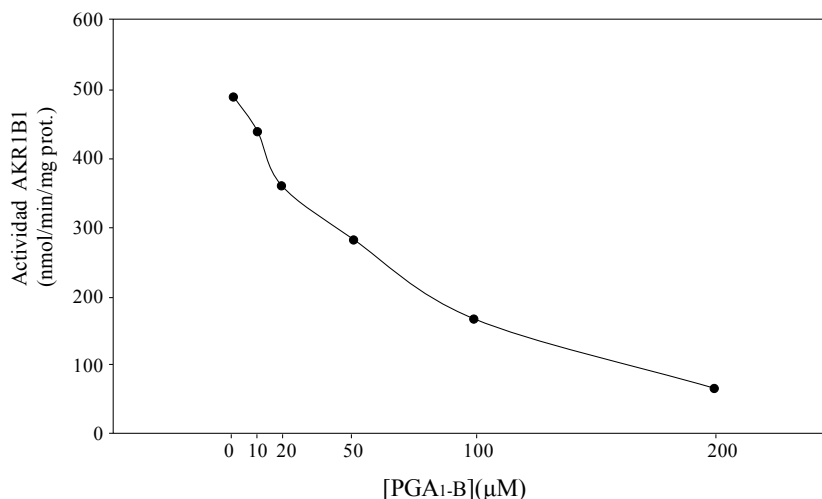
B



**Figura 16.- Modificación de la proteína AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>-B.** La proteína AKR1B1 se incubó con vehículo (DMSO) o con PGA<sub>1</sub>-B a las concentraciones que se indican (A) o con 50 μM PGA<sub>1</sub>-B (B) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina peroxidasa y anti-AKR. En B) la AKR1B1 modificada por PGA<sub>1</sub>-B se analizó en paralelo con BSA-B (10 moles de biotina por cada mol de BSA) a las concentraciones que se indican.

Una vez comprobado que la PGA<sub>1</sub>-B se une a la proteína AKR1B1 recombinante, se procedió a explorar el efecto de dicha PG sobre la actividad enzimática de AKR1B1.

Se monitorizó la actividad AKR1B1 en presencia de concentraciones crecientes de PGA<sub>1</sub>-B. En estas condiciones no se observó efecto alguno de PGA<sub>1</sub>-B sobre la actividad enzimática de AKR1B1. Por lo tanto, se monitorizó la actividad AKR1B1 después de la preincubación de la proteína con concentraciones crecientes de PGA<sub>1</sub>-B durante 2 horas, a temperatura ambiente. Como se observa en la figura 17, en estas condiciones experimentales, el análogo biotinilado de PGA<sub>1</sub> inhibió la actividad enzimática de AKR1B1 de forma dependiente de la concentración. Sin embargo, la constante IC<sub>50</sub> obtenida (50,11 μM), resultó ser mayor que la obtenida con PGA<sub>1</sub> en las mismas condiciones experimentales (16,98 μM).



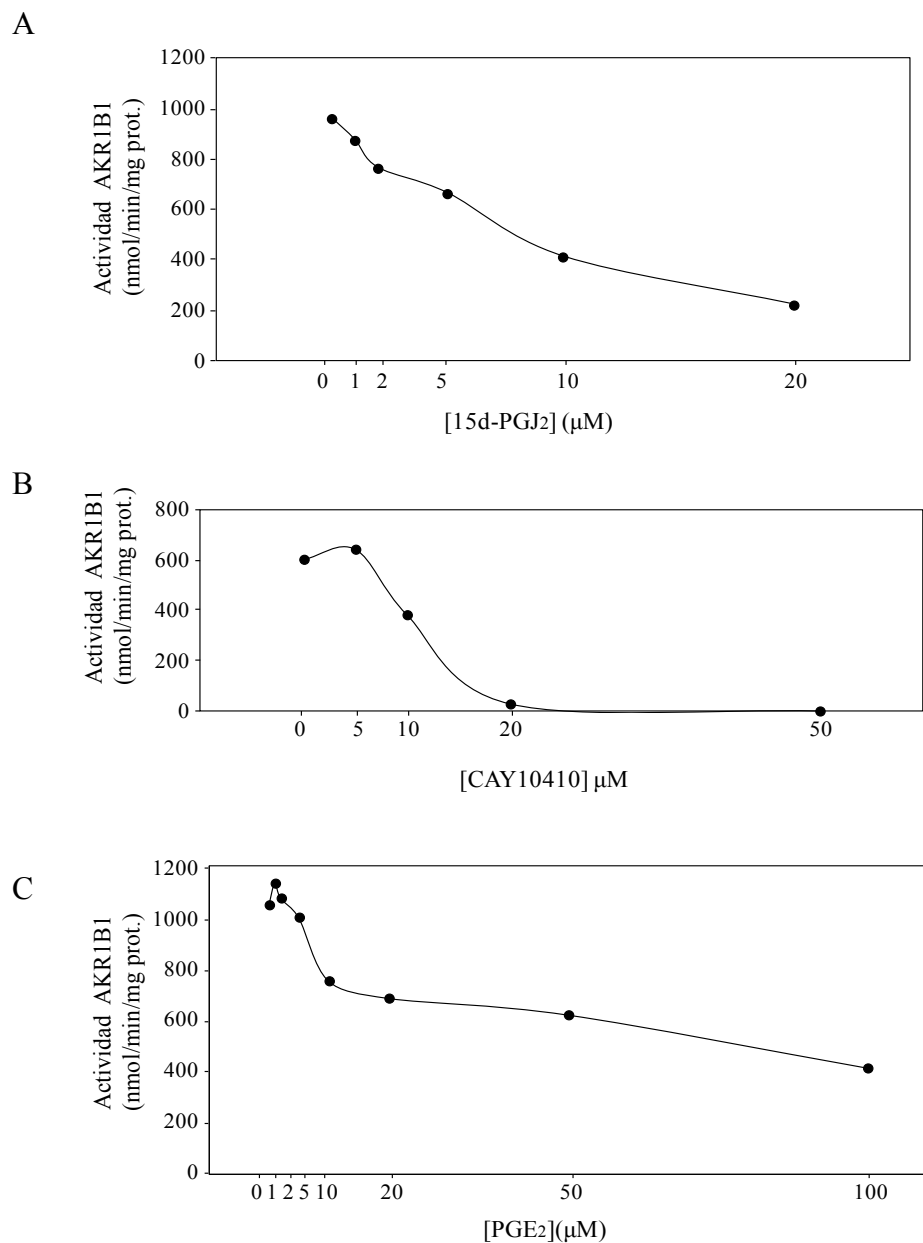
**Figura 17.- Efecto de PGA<sub>1</sub>-B sobre la actividad de AKR1B1.** La proteína AKR1B1 se incubó con PGA<sub>1</sub>-B a las concentraciones que se indican en la figura, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se monitorizó la actividad AKR1B1 de la mezcla de preincubación diluida 10 veces. Los resultados son la media de 2 experimentos.

## 5.- INTERACCIÓN DE OTRAS PG Y COMPUESTOS ANÁLOGOS CON AKR1B1

Las cyPG se caracterizan estructuralmente por poseer un carbono electrófilo en el anillo de ciclopentano. Dada la alta reactividad de esta estructura, las cyPG llevan a cabo la mayoría de sus efectos biológicos mediante la unión covalente a proteínas celulares. El siguiente objetivo consistió en analizar la importancia de la estructura ciclopentenona, así como de otros motivos estructurales, en la inhibición y modificación de la proteína AKR1B1.

En primer lugar, se analizó la capacidad de otras PG estructuralmente relacionadas con PGA<sub>1</sub>, de inhibir la actividad AKR1B1. En concreto, se monitorizó la actividad enzimática de AKR1B1 en presencia de: 15d-PGJ<sub>2</sub>, una cyPG de la serie J; 9,10-dihidro-15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (CAY10410), análogo de 15d-PGJ<sub>2</sub> que no posee estructura ciclopentenona, pero sí un carbono electrófilo en su estructura; o de PGE<sub>2</sub>, PG que no posee carbonos electrófilos en su estructura (En la tabla 3 aparecen representadas las estructuras de cada uno de los compuestos utilizados). Como se observa en la figura 18, todos los compuestos provocaron una disminución de la actividad AKR1B1 dependiente de la concentración. En la tabla 3 se muestran las constantes IC<sub>50</sub> de todos los compuestos ensayados. Los compuestos 15d-PGJ<sub>2</sub> y

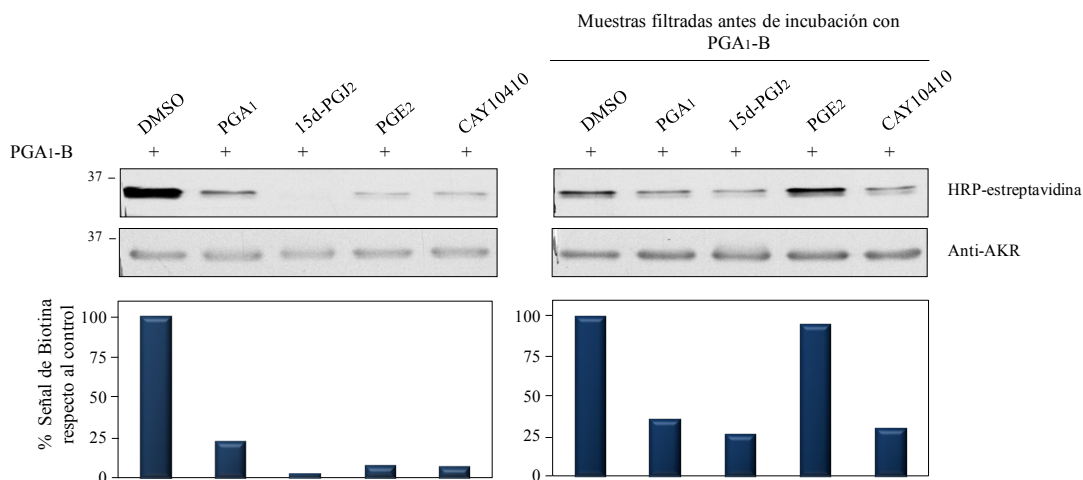
CAY10410 fueron los que ejercieron una inhibición mayor, con  $IC_{50}$  del orden de  $10 \mu M$ .



**Figura 18.- Efecto de diversas PG y compuestos análogos sobre la actividad de AKR1B1.** Se monitorizó la actividad enzimática de AKR1B1 en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub>, CAY10410 o PGE<sub>2</sub> a las concentraciones que se indican. Los resultados son la media de 2 experimentos.



Para evaluar las características de la interacción de estos compuestos con la AKR1B1 se analizó su capacidad de bloquear la unión del análogo biotinilado de  $\text{PGA}_1$  a la proteína. En primer lugar, se preincubó la proteína en presencia de un exceso del compuesto de interés. Posteriormente las muestras se dividieron en dos alícuotas, y una de ellas se sometió a filtración en gel para eliminar el exceso de compuesto. A continuación, todas las muestras se incubaron con  $\text{PGA}_1\text{-B}$ . En la figura 19 se puede observar que todos los compuestos, incluyendo la propia  $\text{PGA}_1$ , compiten con  $\text{PGA}_1\text{-B}$  por la unión a la proteína AKR1B1, aunque en diferente grado. Sin embargo, cuando las muestras son sometidas a filtración en gel previamente a la incubación con  $\text{PGA}_1\text{-B}$ , en todos los casos se produce una cierta recuperación de la incorporación de biotina a la proteína. En el caso de los compuestos con carbonos electrófilos esta recuperación fue parcial, lo que sugiere que la interacción de estos compuestos con la proteína se reduce sólo parcialmente tras la filtración, por lo que la unión de estos compuestos a la proteína AKR1B1 podría tener un componente irreversible.



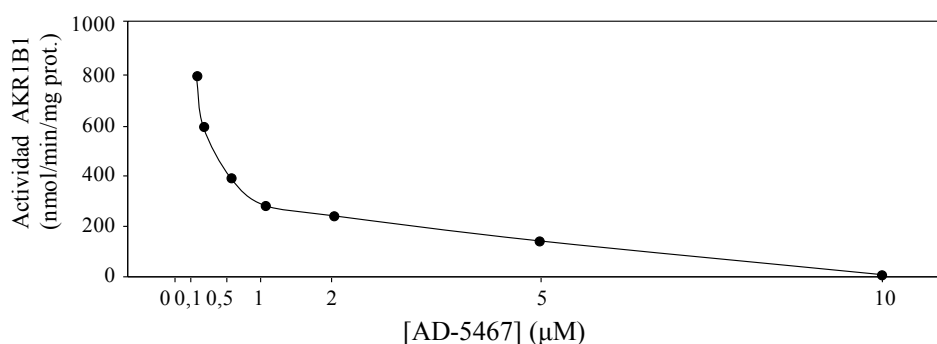
**Figura 19.- Interacción de diversas PG y compuestos análogos con la proteína AKR1B1.**

La proteína AKR1B1 se incubó con los compuestos que se indican a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  o vehículo (DMSO) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se dividieron en dos, y una de ellas se sometió a filtración en gel. Después se incubaron todas las muestras con 1  $\mu\text{M}$   $\text{PGA}_1\text{-B}$ , durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina peroxidasa y anti-AKR. Se muestra la cuantificación de la señal de biotina corregida con respecto a la señal de AKR. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres ensayos realizados.

La única excepción ocurre en el caso de PGE<sub>2</sub>, con la que no se observó competición con PGA<sub>1</sub>-B después de la filtración en gel, lo que indica que la interacción de esta PG con la proteína se revierte totalmente. Esta observación concuerda con el hecho de que no posee carbono electrófilo en su estructura, lo que sugiere que su interacción con la AKR1B1 no es covalente.

## 6.- EFECTO DE OTROS INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AKR1B1

Se exploró el efecto sobre la actividad enzimática de AKR1B1 de algunos inhibidores ya conocidos, como AD-5467 y zopolrestat, y de otros identificados por otros grupos de investigación, como CMTI. En la figura 20 se muestra la curva concentración-respuesta obtenida con AD-5467, en la que se observa una inhibición de la actividad AKR1B1 dependiente de la concentración del inhibidor, con una IC<sub>50</sub> de 0,45  $\mu$ M. Las constantes IC<sub>50</sub> obtenidas para el zopolrestat y el CMTI fueron de 0,034 y 0,25  $\mu$ M, respectivamente. Las IC<sub>50</sub> obtenidas con estos compuestos resultaron entre 2 y 3 órdenes de magnitud menores que las obtenidas para las PG, valores que se corresponden con los descritos en la bibliografía.

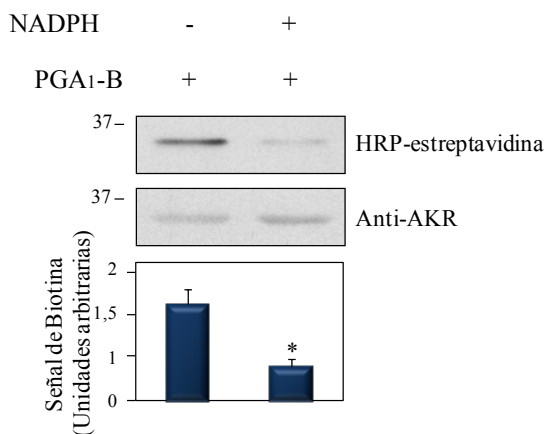


**Figura 20.- Efecto del AD-5467 sobre la actividad AKR1B1.** Se monitorizó la actividad AKR1B1 en presencia del AD-5467 a las concentraciones que se indican. Los resultados son la media de 2 experimentos.

### 6.1.- Efecto de NADPH y NADP<sup>+</sup> sobre la actividad enzimática de AKR1B1

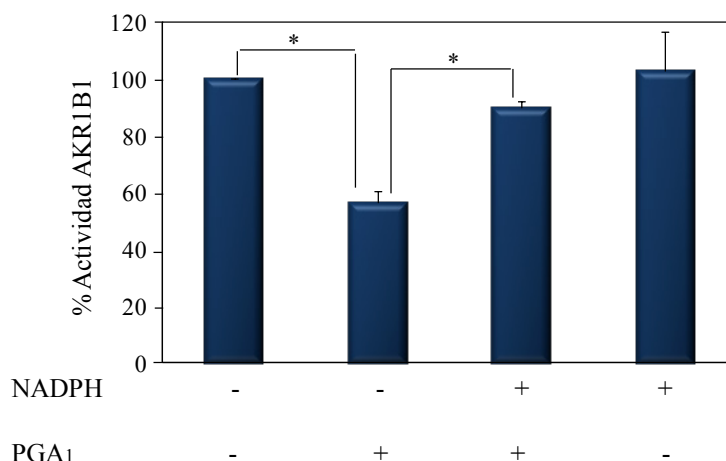
La proteína AKR1B1 puede ser modificada por lípidos electrófilos, tales como HNE, a través del residuo de Cys298 presente en el centro activo. Se ha descrito que la presencia del NADPH protege al residuo de Cys298 de la proteína AKR1B1 de la modificación por lípidos electrófilos (Srivastava et al., 2002).

En base a estas observaciones, a continuación exploramos si la presencia del nucleótido NADPH podría alterar la unión de PGA<sub>1</sub>-B a AKR1B1 y/o interferir en la inhibición de la actividad enzimática por PGA<sub>1</sub>. Primeramente, se llevó a cabo un ensayo de competición entre NADPH y PGA<sub>1</sub>-B por la unión a la proteína AKR1B1. Como se observa en la figura 21, la señal de biotina procedente de la muestra preincubada con NADPH es significativamente menor que la de la muestra control. Este resultado indica que el nucleótido reduce la unión de PGA<sub>1</sub>-B a la proteína.



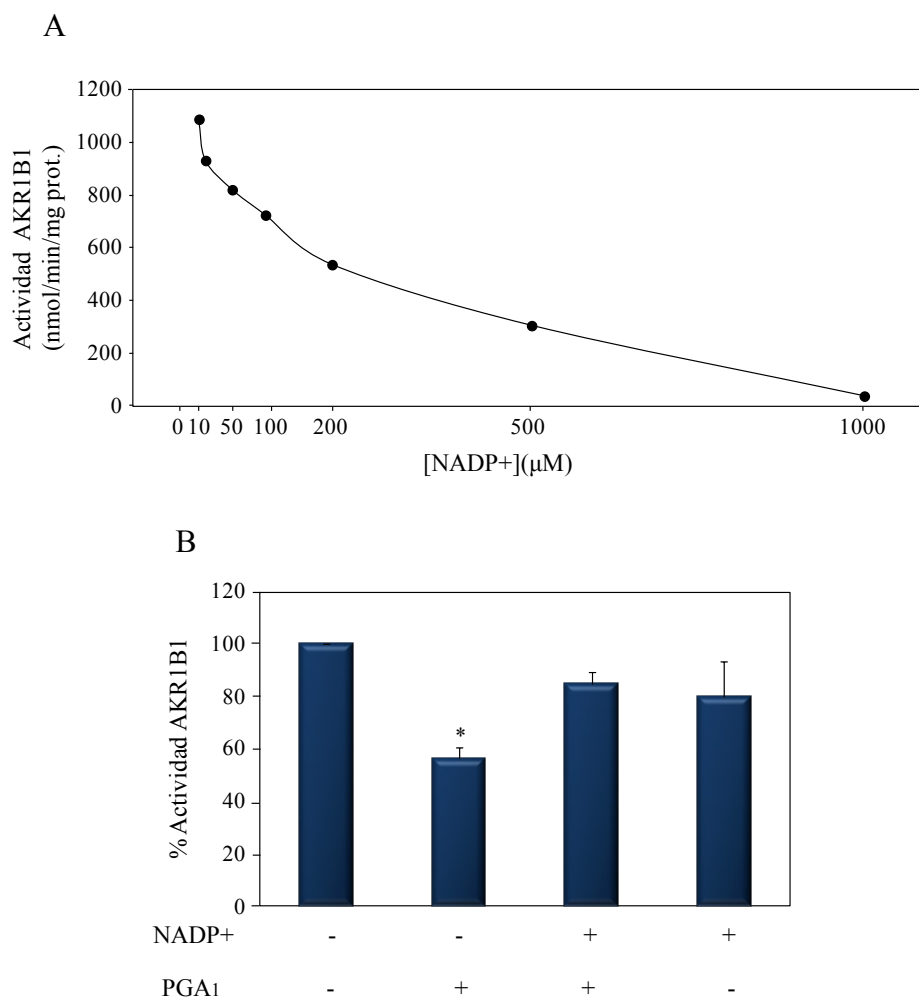
**Figura 21.- Efecto del NADPH sobre la unión de PGA<sub>1</sub>-B a la proteína AKR1B1.** La proteína se incubó con 100  $\mu$ M NADPH o vehículo (H<sub>2</sub>O) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió a dicha mezcla 1  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>-B, y se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina peroxidasa y anti-AKR. Se muestra la cuantificación de la señal de biotina corregida con respecto a la señal de AKR. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición sin NADPH.

Posteriormente, se analizó si la presencia del nucleótido podría interferir con la inhibición de la enzima por PGA<sub>1</sub>. Como se observa en la figura 22, la preincubación de AKR1B1 con NADPH redujo significativamente la inhibición de AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>. Este resultado se obtuvo con 200  $\mu$ M de NADPH, concentración que se utiliza en los ensayos de actividad. Durante el transcurso del experimento, una cantidad inferior al 10% del NADPH total utilizado se oxidó de forma espontánea a NADP<sup>+</sup>.



**Figura 22.- Efecto de NADPH sobre la inhibición de AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>.** La proteína AKR1B1 se incubó con 200  $\mu$ M NADPH o vehículo (H<sub>2</sub>O) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 10  $\mu$ M PGA<sub>1</sub> o vehículo (DMSO), y toda la mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente se midió la actividad AKR1B1. Se muestra el % de actividad AKR1B1 con respecto al control. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición que se indica.

A continuación nos interesó comprobar si el NADP<sup>+</sup> podría también reducir la inhibición de AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>. En primer lugar se monitorizó la actividad AKR1B1 en presencia de NADP<sup>+</sup> a concentraciones crecientes, con objeto de analizar si este nucleótido podría inhibir la actividad de AKR1B1 en nuestras condiciones experimentales (Bhatnagar et al., 1988). Como se observa en la figura 23A, el NADP<sup>+</sup> redujo la actividad AKR1B1 de forma dependiente la concentración, con una IC<sub>50</sub> de 177,82  $\mu$ M. Seguidamente se exploró el efecto de NADP<sup>+</sup> en la inhibición de AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>. Basándonos en el valor de IC<sub>50</sub> obtenido, se utilizó una concentración de NADP<sup>+</sup> de 100  $\mu$ M que produjo una inhibición moderada de la actividad de AKR1B1. Como se observa en la figura 23B, la presencia de NADP<sup>+</sup> también impidió la inhibición de AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>. En conjunto, estos resultados indican que la presencia de los nucleótidos NADP<sup>+</sup> o NADPH protege a la enzima AKR1B1 de la inhibición por PGA<sub>1</sub>. En la tabla 3 se presenta un resumen de los distintos compuestos estudiados como inhibidores de la AKR1B1 y de las constantes IC<sub>50</sub> obtenidas en las distintas condiciones experimentales.



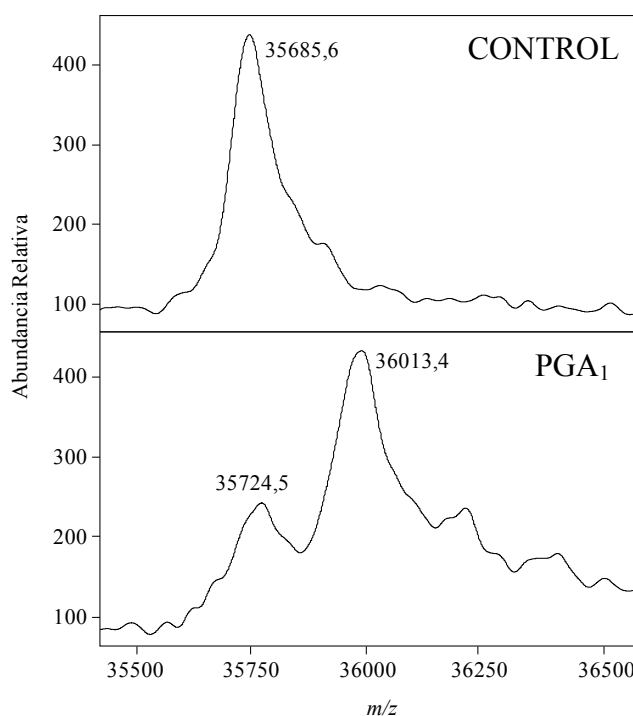
**Figura 23.- Efecto de NADP<sup>+</sup> sobre la actividad de AKR1B1 y su inhibición por PGA<sub>1</sub>.** A) Se monitorizó la actividad enzimática de AKR1B1 en presencia de NADP<sup>+</sup> a las concentraciones indicadas en la figura. B) La proteína AKR1B1 se incubó con 100  $\mu$ M NADP<sup>+</sup> o vehículo (H<sub>2</sub>O) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 10  $\mu$ M PGA<sub>1</sub> o vehículo (DMSO), y toda la mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente se midió la actividad AKR1B1. Se muestra el % de actividad AKR1B1 con respecto al control. Los resultados son la media de 2 experimentos en A) y la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos en B). \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición control.

Compuesto	Estructura	IC50 (μM)
PGA1		20,64 16,98 * 6,16 #
PGA1-B		50,11 *
15d-PGJ2		9,48
PGE2		79,43
CAY10410		10,7
AD-5467		0,45
+CMTI		0,25
Zopolrestat		0,034
NADP+		177,82

## 7.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR PGA<sub>1</sub>

### 7.1.- Estudio de la modificación de la proteína recombinante AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>

Se analizó la modificación de la proteína recombinante AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>, utilizando MS mediante MALDI-TOF.

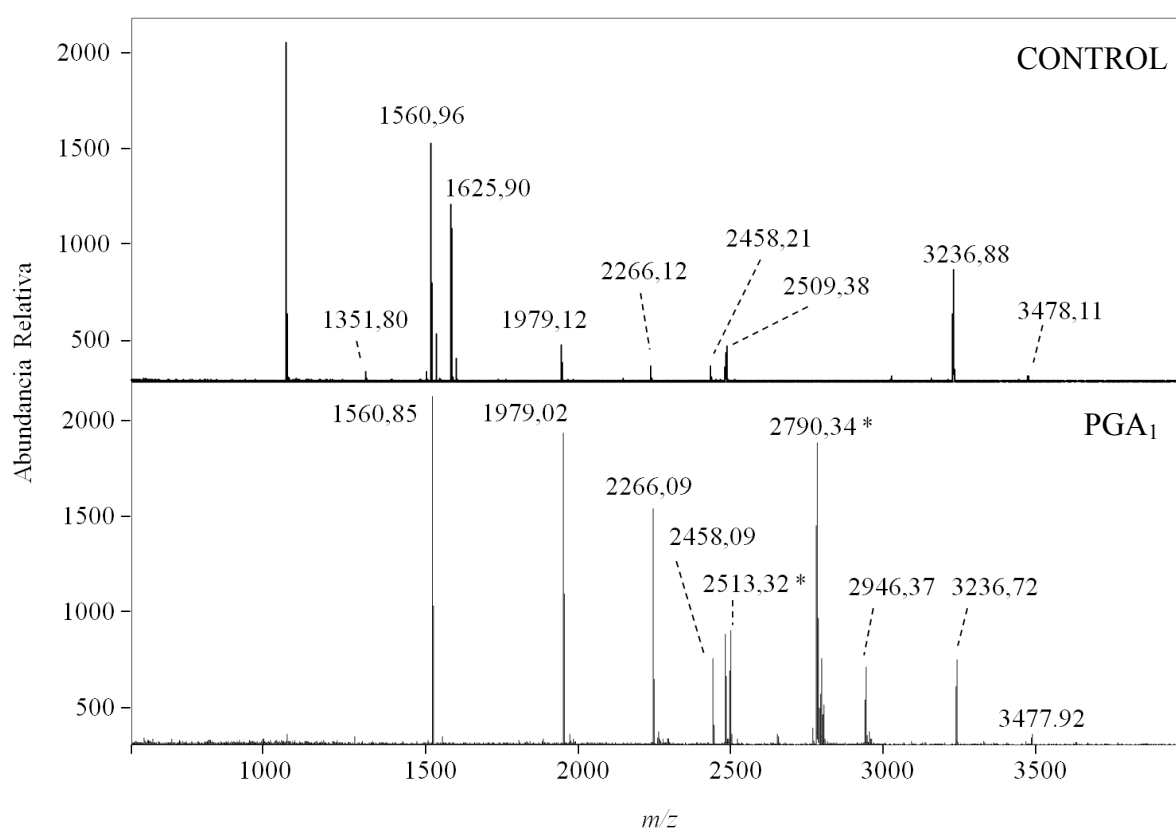


**Figura 24.- Análisis por MS mediante MALDI-TOF de la modificación de la proteína AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>.** La proteína recombinante AKR1B10 (1  $\mu$ g) fue incubada con vehículo (DMSO) ó 50  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>, durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente fue analizada por MS mediante MALDI-TOF.

En la figura 24 se muestran los espectros obtenidos con la proteína control y la incubada con PGA<sub>1</sub>. En el espectro correspondiente a la proteína control, se observa un pico mayoritario con una  $m/z$  de 35685,6, que se corresponde con la AKR1B10 (Mm teórica 36020 Da). En el espectro obtenido con la proteína incubada con PGA<sub>1</sub>, se observan dos picos mayoritarios. Un pico de  $m/z$  35724,5, compatible con la proteína no modificada por PGA<sub>1</sub>, pero que podría haber sufrido oxidaciones u otras modificaciones en algún residuo. El segundo pico, de mayor abundancia relativa, con

$m/z$  36013,4, posee un incremento de  $m/z$  con respecto a la muestra control (+327,8) compatible con la incorporación de una molécula de  $\text{PGA}_1$  a la proteína AKR1B10.

Con el fin de identificar el residuo por el que  $\text{PGA}_1$  se une a la AKR1B10, la proteína incubada con vehículo (DMSO) o  $\text{PGA}_1$ , se sometió a digestión triptica y posterior análisis por MS mediante MALDI-TOF (Figura 25). En la huella peptídica de la proteína tratada con  $\text{PGA}_1$  se observan dos péptidos que no aparecen en la huella peptídica de la proteína control. Uno de ellos, con  $m/z$  2790,34, es compatible con la adición de una molécula de  $\text{PGA}_1$  en el péptido 298-318, que contiene la Cys299.



**Figura 25.- Análisis por MS mediante MALDI-TOF de la digestión triptica de AKR1B10 modificada por  $\text{PGA}_1$ .** La proteína recombinante AKR1B10 (1  $\mu\text{g}$ ) fue incubada con vehículo (DMSO) ó 50  $\mu\text{M}$   $\text{PGA}_1$ , durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente sometida a digestión con tripsina. Finalmente las muestras se purificaron con columnas de Zip Tip C18, y se analizaron por MS mediante MALDI-TOF. En el espectro se muestra la  $m/z$  de algunos de los péptidos obtenidos en el análisis. Los señalados con asterisco corresponden a los péptidos con  $m/z$  compatible con la adición de una molécula de  $\text{PGA}_1$ . Los resultados son representativos de 3 experimentos.

El otro péptido, con  $m/z$  2513,32, presenta un incremento compatible con la adición de una molécula de  $\text{PGA}_1$  al péptido 178-195, que contiene la Cys187. En la tabla 4

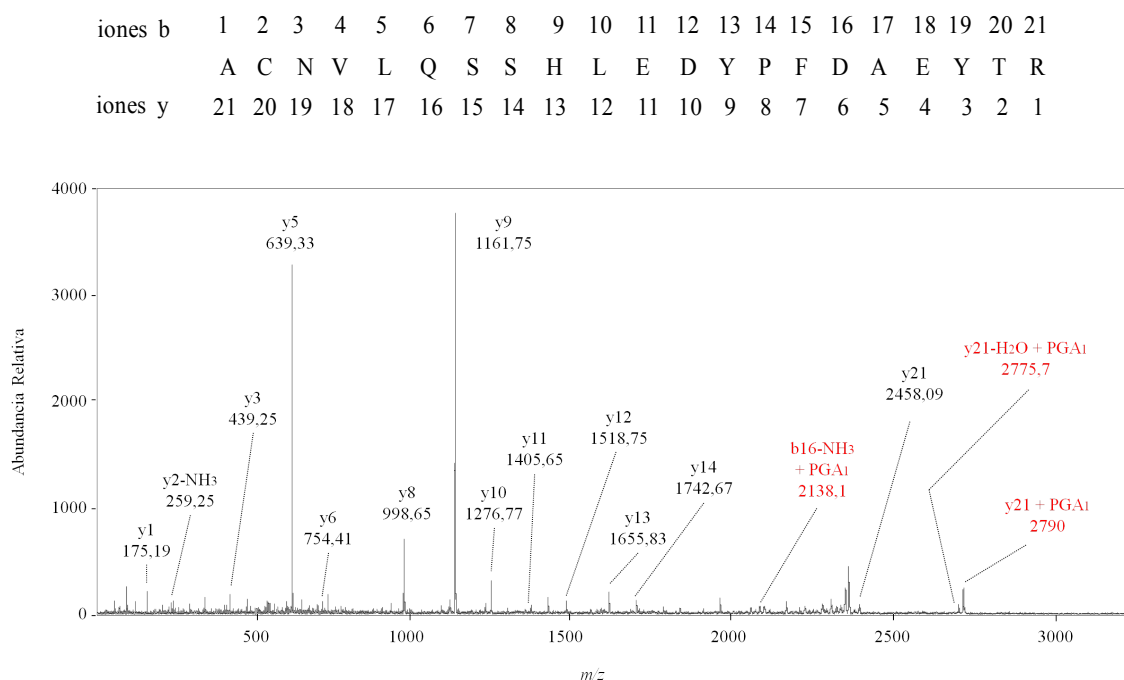


aparecen detallados los péptidos obtenidos en la digestión triptica de la proteína control y de la tratada con PGA<sub>1</sub>.

**Tabla 4.- Resumen de los péptidos obtenidos en el análisis por MS mediante MALDI-TOF de la digestión con tripsina de la proteína AKR1B10 incubada con DMSO (control) o con PGA<sub>1</sub>.** Se muestran las *m/z* teórica y experimental de los péptidos, así como su secuencia y su posición en la proteína AKR1B10.

<i>m/z</i> Teórico	<i>m/z</i> Experimental		Posición	Secuencia
	Control	+ PGA <sub>1</sub>		
1351,72	1351,80		270-280	IVENIQVFDFK
1560,86	1560,96	1560,85	79-90	LWPTFFERPLVR
1625,78	1625,90		281-294	LSDEEMATILSFNR
1979,04	1979,11	1979,02	102-117	LSYLDVYLHWPGGFK
2177,06	2177,22		178-195	YKPVTNQVECHPYLTQEK
2266,09	2266,12	2266,09	136-155	ATFLDAWEAMEELVDEGLVK
2458,09	2458,21	2458,09	298-318	ACNVLQSSHLEDYPFDAEYTR
2509,18	2509,38		326-347	LISEEDLAANDILDYKDDDDKV
2177,06		2513,32 (+PGA <sub>1</sub> )	178-195	YKPVTNQVECHPYLTQEK (+PGA <sub>1</sub> )
2458,09		2790,34 (+PGA <sub>1</sub> )	298-318	ACNVLQSSHLEDYPFDAEYTR (+PGA <sub>1</sub> )
2946,67		2946,37	67-90	AVKREDLFIVSKLWPTFFERPLVR
3236,64	3236,88	3236,72	204-233	GITVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSLLEDPK
3477,82	3478,11	3477,92	204-235	GITVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSLLEDPKIK

A continuación, los péptidos potencialmente modificados por PGA<sub>1</sub>, fueron sometidos a análisis por MS/MS mediante MALDI-TOF-TOF, con objeto de confirmar su identidad. En ambos casos se obtuvieron iones *y* y *b* de *m/z* compatibles con la secuencia de los péptidos 178-195 y 298-318 respectivamente. En la figura 26 se muestra el espectro de MS/MS del péptido con *m/z* 2790,34. Como puede observarse, los iones con *m/z* 2138,1, 2775,7 y 2790 presentan un incremento compatible con la adición de una molécula de PGA<sub>1</sub> en los iones b16-NH<sub>3</sub>, y21-H<sub>2</sub>O e y21 respectivamente. Estos resultados indican que la PGA<sub>1</sub> se une covalentemente a la proteína recombinante AKR1B10 y que esta unión podría producirse a través de los residuos Cys299 o Cys187.



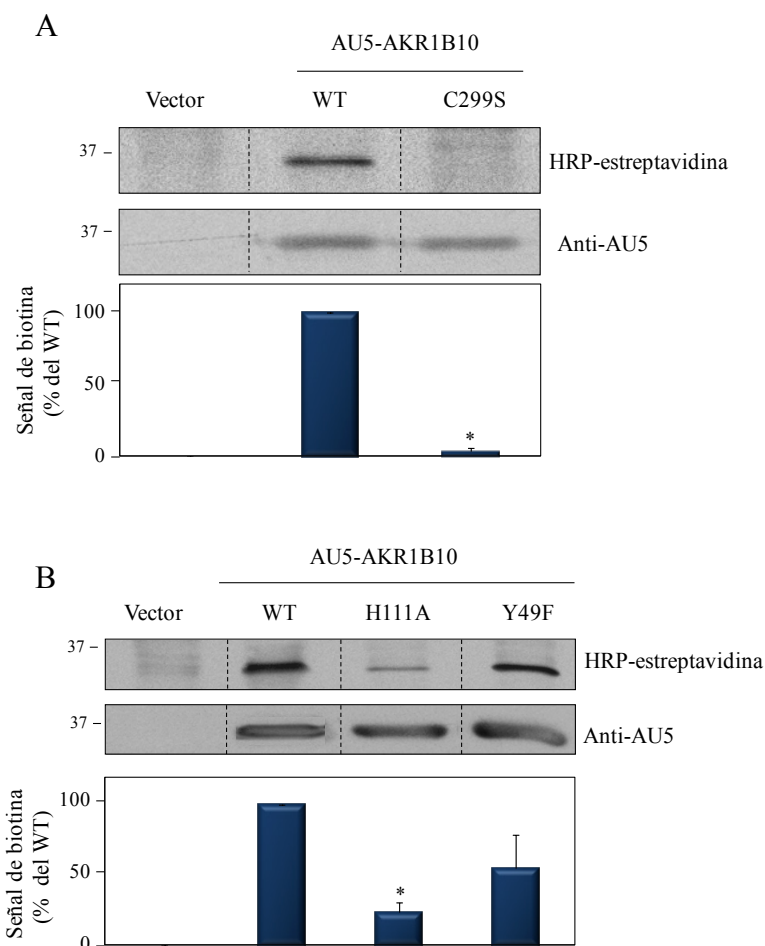
**Figura 26.- Análisis por MS/MS mediante MALDI-TOF-TOF de uno de los péptidos potencialmente modificados por PGA<sub>1</sub>.** El péptido de  $m/z$  2790 procedente de la digestión con tripsina de la proteína incubada con PGA<sub>1</sub>, fue analizado por MS/MS mediante MALDI-TOF-TOF. En el espectro se muestra la  $m/z$  de algunos de los iones obtenidos en el análisis.

## 7.2.- Estudio de la modificación de la proteína AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>-B en células COS-7

Se procedió a comprobar si la modificación de la proteína AKR1B10 por PGA<sub>1</sub> podría ocurrir en un sistema celular. Para ello, las células COS-7 fueron transfectadas transtoriamente con el vector pCEFL-AU5-AKR1B10-WT y posteriormente tratadas con PGA<sub>1</sub>-B. Como puede observarse en la figura 27A, en la muestra procedente de las células transfectadas con el vector AU5-AKR1B10-WT aparece señal de biotina que no se detecta en la muestra procedente de las células transfectadas con el vector vacío, lo que indica que la PGA<sub>1</sub>-B modifica a la proteína AKR1B10-WT expresada en células COS-7.

El residuo de Cys299 se encuentra ubicado en el centro activo de la enzima, y tiene un papel muy importante tanto en la estabilización del sustrato durante la catálisis, como en la unión de algunos inhibidores al centro activo de la enzima (Verma et al., 2008). Con el fin de caracterizar la importancia de este residuo en la unión de PGA<sub>1</sub> a la proteína AKR1B10, se utilizó el vector de expresión pCEFL-AU5-AKR1B10-

Cys299Ser. En las células transfectadas con este vector que codifica la proteína AKR1B10 con el residuo Cys299 mutado por serina, la señal de biotina asociada a la proteína es prácticamente indetectable (Figura 27A), lo que indica que la unión de PGA<sub>1</sub>-B a la AKR1B10 ocurre principalmente a través de la Cys299.



**Figura 27.- Modificación de la proteína AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>-B expresada en células COS-7.** Las células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con el vector pCEFL-AU5-AKR1B10-WT o los mutantes que se indican en cada caso, y posteriormente tratadas con vehículo (DMSO) ó 30  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>-B, durante 2 horas a 37 °C. Los lisados celulares totales se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina peroxidasa o con el anticuerpo anti-AU5. Se muestra la cuantificación de la señal de biotina, corregida con respecto a la señal de proteína. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos en A y 3 experimentos en B. \*  $p \leq 0,05$  con respecto al WT.

Los residuos His111 y Tyr49 participan en la estabilización de un gran número de inhibidores de la AKR1B10 en su unión al centro activo de la enzima (Endo et al., 2009; Matsunaga et al., 2009). Para estudiar si estos residuos también podrían contribuir a la unión de la PG al centro activo de AKR1B10, se utilizaron los vectores de expresión pCEFL-AU5-AKR1B10-Tyr49Phe e His111Ala. Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente con dichas construcciones, y posteriormente se trataron con PGA<sub>1</sub>-B. Como se observa en la figura 27B, la unión de PGA<sub>1</sub>-B a la proteína AKR1B10 disminuyó en ausencia del residuo Tyr49 y se redujo significativamente en el mutante His111Ala, en comparación con la proteína WT. Estos resultados indican que ambos residuos podrían contribuir a la estabilización de la unión de la PG al centro activo de AKR1B10, siendo algo mayor la contribución del residuo His111.

## **8.- CARACTERIZACIÓN DE LA REPERCUSIÓN FUNCIONAL DE LA MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR PGA<sub>1</sub>**

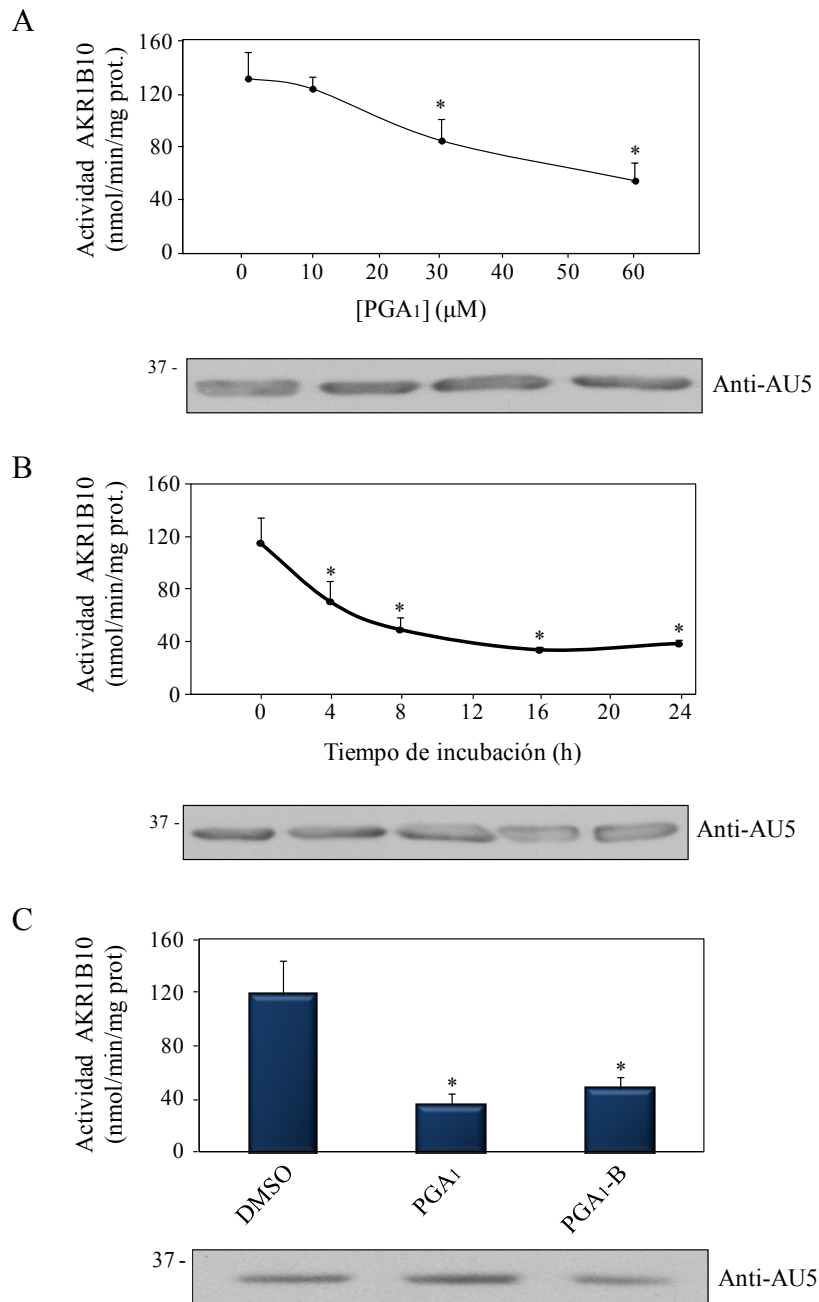
La PGA<sub>1</sub> se une covalentemente a la proteína AKR1B10 a través del residuo Cys299, y además establece interacciones con los residuos Tyr49 e His111, ubicados en el centro activo de la proteína. A continuación se procedió al análisis de la repercusión funcional de esta interacción.

### **8.1.- Efecto de PGA<sub>1</sub> sobre la actividad enzimática de AKR1B10**

En primer lugar, se midió la actividad enzimática de AKR1B10 en las fracciones S100 procedentes de células COS-7, previamente transfectadas con el vector pCEFL-AU5-AKR1B10-WT y tratadas con concentraciones crecientes de PGA<sub>1</sub>.

Se comprobó previamente que en la fracción S100 de las células COS-7 no transfectadas no se podía detectar ninguna actividad enzimática con capacidad de oxidar NADPH en estas condiciones de ensayo.

Como se observa en la figura 28A, la PGA<sub>1</sub> produjo una disminución de la actividad enzimática de AKR1B10 con respecto al control, dependiente de la concentración. La inhibición resultó significativa a concentraciones de 30 y 60  $\mu$ M de PGA<sub>1</sub>.



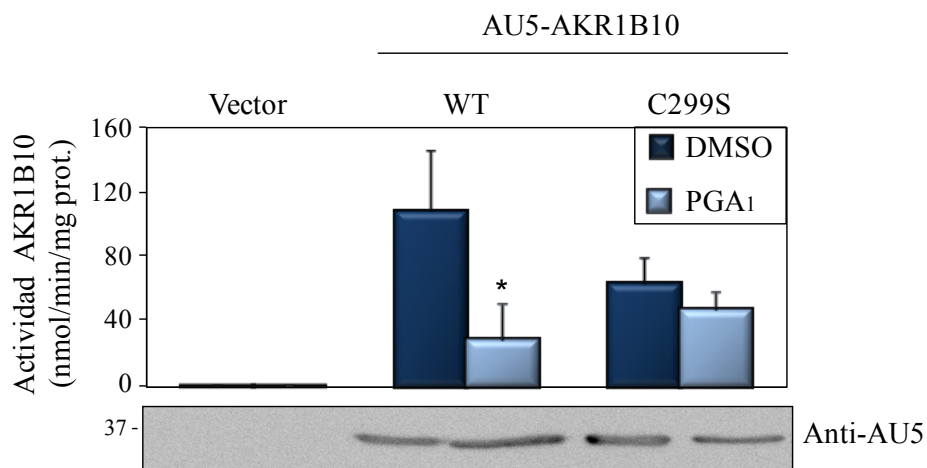
**Figura 28.- Efecto de PGA<sub>1</sub> y PGA<sub>1</sub>-B sobre la actividad enzimática de la proteína AKR1B10 expresada en células COS-7.** Las células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con el vector pCEFL-AU5-AKR1B10-WT y posteriormente tratadas con vehículo (DMSO) o (A) PGA<sub>1</sub> a las concentraciones que se indican, durante 24 horas; (B) 60 μM PGA<sub>1</sub> a los tiempos que se indican; (C) 60 μM PGA<sub>1</sub> o PGA<sub>1</sub>-B durante 24 horas. Posteriormente, se monitorizó la actividad enzimática de la proteína AKR1B10 en las fracciones S100 obtenidas. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos en A y B, y 5 experimentos en C. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición control. En el panel inferior se muestran los niveles de proteína AKR1B10 en las distintas condiciones, analizados mediante Western blot con anticuerpo frente al epítipo AU5.

Por otro lado, la inhibición de la actividad de AKR1B10 aumentó con la duración del tratamiento de las células con  $\text{PGA}_1$  (Figura 28B). A las 4 horas de tratamiento con  $\text{PGA}_1$ , la inhibición fue de aproximadamente un 40 %, alcanzándose la inhibición máxima, cercana al 60 %, entre las 16 y 24 horas de tratamiento. Además, como se observa en los resultados obtenidos mediante Western blot, los niveles de la proteína AKR1B10 no resultaron afectados en las distintas condiciones de tratamiento con  $\text{PGA}_1$ . Estos resultados muestran que la  $\text{PGA}_1$  provoca la inhibición de la actividad enzimática de la proteína AKR1B10 expresada en las células COS-7, que podría estar mediada por su modificación covalente.

A continuación, se procedió a comprobar si la  $\text{PGA}_1$ -B podría reproducir el efecto observado con  $\text{PGA}_1$  sobre la actividad enzimática de la AKR1B10. Como se observa en la figura 28C, el tratamiento con  $\text{PGA}_1$ -B produjo una disminución significativa de la actividad enzimática de AKR1B10 con respecto al control, de la misma magnitud que la producida por  $\text{PGA}_1$ . Tal como se observa en el panel inferior de la figura 28C, ni la presencia de  $\text{PGA}_1$  ni la de su análogo biotinilado afectaron a los niveles de la proteína AKR1B10. Estos resultados demuestran que  $\text{PGA}_1$ -B reproduce el efecto de la PG no biotinilada sobre la actividad de AKR1B10 expresada en células COS-7, lo que sugiere que este compuesto puede constituir una herramienta adecuada para el estudio de algunos aspectos de la repercusión funcional de la modificación de la AKR1B10 en células.

## **8.2.- Estudio de la importancia de los residuos Cys299, Tyr49 e His111 en la inhibición de AKR1B10 por $\text{PGA}_1$**

A continuación, nos interesó analizar la importancia de los residuos Cys299, Tyr49 e His111 en la inhibición de la actividad enzimática de AKR1B10 por  $\text{PGA}_1$ . Para ello, las células COS-7 se transfectaron transitoriamente con los vectores pCEFL-AU5-AKR1B10-WT, Cys299Ser, Tyr49Phe o His111Ala, y se trataron posteriormente con  $\text{PGA}_1$ .



**Figura 29.- Estudio de la importancia del residuo Cys299 en la inhibición de AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>.** Las células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con el vector pCEFL-AU5-AKR1B10-WT o C299S, y posteriormente tratadas con vehículo (DMSO) ó 60  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>-B durante 24 horas. Finalmente se monitorizó la actividad enzimática de AKR1B10 en las fracciones S100 obtenidas. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. \*  $p \leq 0,05$  respecto a la condición control. En el panel inferior se muestran los niveles de proteína AKR1B10 en las distintas condiciones, analizados mediante Western blot con anticuerpo frente al epítipo AU5.

Como se observa en la figura 29, la actividad enzimática de la proteína mutada en el residuo de Cys299 fue considerablemente menor que la actividad de la proteína WT. Sin embargo en este caso, tras el tratamiento con PGA<sub>1</sub>, no se apreció una disminución significativa de la actividad con respecto a la condición control. No obstante, ni la ausencia del residuo Cys299 ni la presencia de PGA<sub>1</sub> afectaron los niveles de la proteína AKR1B10. Por otra parte, en las fracciones S100 procedentes de las células transfectadas con los mutantes Tyr49Phe e His111Ala no se detectó actividad AKR en estas condiciones. En conjunto, estos resultados revelan por un lado, que los residuos Cys299, Tyr49 e His111 son fundamentales en el proceso catalítico de la AKR1B10, lo que coincide con los datos descritos en la literatura (Tarle et al., 1993; Verma et al., 2008). Por otro lado, el efecto inhibitor de PGA<sub>1</sub> sobre la actividad enzimática de la AKR1B10 es dependiente de la presencia del residuo Cys299 del centro activo de la enzima.

## **9.- EFECTO DE DIVERSAS PG CON ESTRUCTURA CICLOPENTENONA Y DE INHIBIDORES CONOCIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE AKR1B10**

Una vez comprobado que  $\text{PGA}_1$  inhibe la actividad de la AKR1B10, se procedió a explorar las características estructurales de las PG que resultan más favorables para la inhibición. Para ello, se monitorizó la actividad enzimática de la AKR1B10 en las fracciones S100 de células COS-7 tratadas con varias PG y otros compuestos estructuralmente relacionados con  $\text{PGA}_1$ , además de algunos inhibidores de la aldosa reductasa descritos en la literatura (Figura 30A).

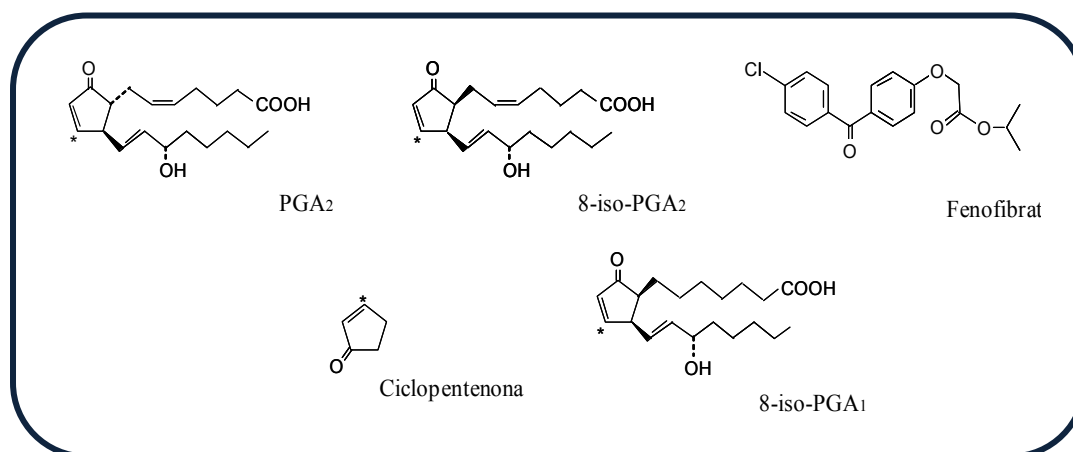
Como se observa en la figura 30B, la  $\text{PGA}_2$  inhibió la actividad AKR1B10 con una intensidad comparable a la de la  $\text{PGA}_1$  y su análogo biotinilado. Sin embargo, los isoprostanos 8-iso- $\text{A}_1$  y 8-iso- $\text{A}_2$  produjeron una inhibición de la actividad significativamente menor que sus isómeros estructurales  $\text{PGA}_1$  y  $\text{PGA}_2$ , respectivamente. Por otro lado, la presencia de ciclopentenona no causó ningún efecto sobre la actividad de AKR1B10 en estas condiciones. Estos resultados indican que las cadenas laterales en la estructura de las cyPG y su orientación son importantes para el efecto inhibitorio de la actividad AKR. Por otro lado, el compuesto AD-5467 produjo una inhibición significativa comparable a la de  $\text{PGA}_1$ , a diferencia del fenofibrato, que no ejerció ningún efecto sobre la actividad AKR1B10. Además, los resultados obtenidos mediante Western blot (Panel inferior figura 30) mostraron que ninguno de los compuestos utilizados produjo una alteración en los niveles de la proteína AKR1B10.

## **10.- ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE LA MODIFICACIÓN E INHIBICIÓN DE AKR1B10 POR $\text{PGA}_1$ -B EN CÉLULAS COS-7**

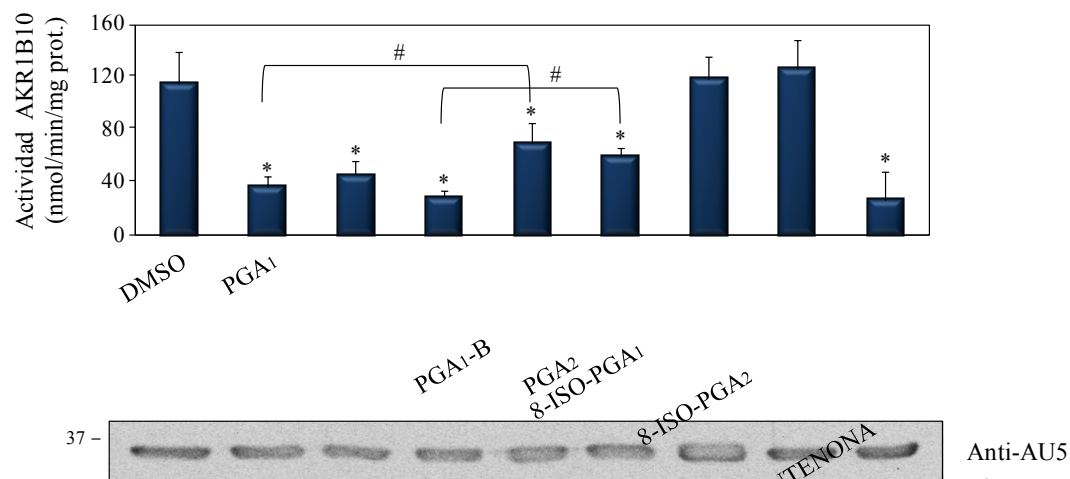
Resultados obtenidos anteriormente en nuestro grupo de investigación demostraron que los análogos biotinilados de 15d-PGJ<sub>2</sub> y  $\text{PGA}_1$  modifican selectivamente proteínas específicas en fibroblastos de ratón, NIH-3T3 (Gayarre et al., 2005). Concretamente, se identificaron proteínas de la familia AKR como dianas selectivas de  $\text{PGA}_1$ -B (Díez-Dacal et al., 2011). Los experimentos expuestos anteriormente demuestran que la  $\text{PGA}_1$ -B modifica a la proteína AKR1B10 humana expresada en células COS-7. Para comprobar si esta modificación también pudiera ser selectiva de  $\text{PGA}_1$ -B en este sistema celular, las células COS-7, previamente transfectadas con el vector AU5-AKR1B10-WT, se trataron con 15d-PGJ<sub>2</sub>-B o  $\text{PGA}_1$ -B.



A



B

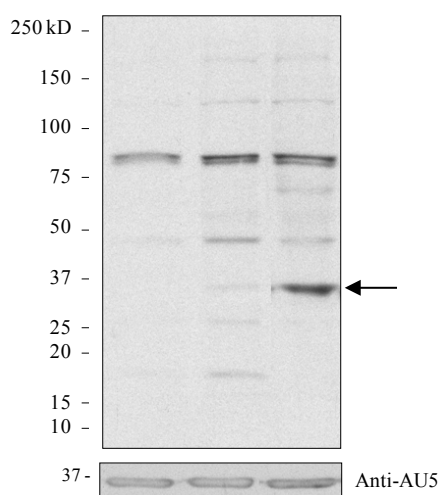


**Figura 30.- Efecto de diversas cyPG y otros compuestos sobre la actividad de AKR1B10.** A) Estructura de los compuestos utilizados en la inhibición de la AKR1B1. B) Las células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con el vector pCEFL-AU5-AKR1B10-WT y posteriormente tratadas con vehículo (DMSO) ó 60  $\mu$ M de los compuestos que se indica durante 24 horas. Finalmente se monitorizó la actividad enzimática AKR1B10 en las fracciones S100 obtenidas. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición control. #  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición que se indica. En el panel inferior se muestran los niveles de proteína AKR1B10 en las distintas condiciones, analizado mediante Western blot con anticuerpo frente al epítipo AU5.

Dado que la capacidad de ambas cyPG de formar aductos con proteínas es diferente (Gayarre et al., 2007), en estos ensayos se emplearon concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub>-B o PGA<sub>1</sub>-B que indujeron un grado similar de modificación de proteínas celulares totales. En estas condiciones, la incorporación de PGA<sub>1</sub>-B a la proteína AKR1B10 fue mayor que la de 15d-PGJ<sub>2</sub>-B (Figura 31A, flecha).

A continuación se comparó el efecto de ambas PG sobre la actividad enzimática de AKR1B10. Como se observa en la figura 31B, a concentraciones equivalentes en cuanto a unión de proteínas, la 15d-PGJ<sub>2</sub> tuvo un efecto menor sobre la actividad de AKR1B10 que la PGA<sub>1</sub>. En conjunto, estos resultados indican que la modificación e inhibición de la proteína AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>-B y PGA<sub>1</sub> respectivamente, es selectiva frente a 15d-PGJ<sub>2</sub> en células COS-7.

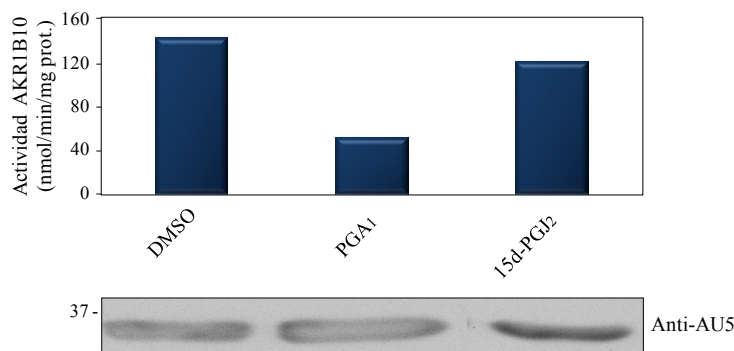
A



**Figura 31.- Estudio de la selectividad de la modificación de AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>-B expresada en células COS-7.**

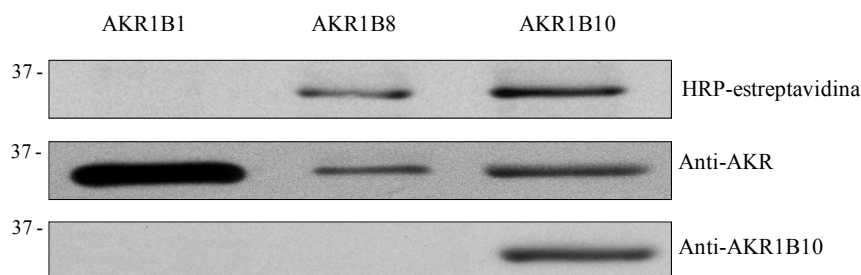
Las células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con el vector pCEFL-AU5-AKR1B10-WT. A) Las células fueron tratadas con vehículo (DMSO), 1  $\mu$ M 15d-PGJ<sub>2</sub>-B ó 10  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>-B, durante 2 horas. Los lisados celulares totales se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina peroxidasa y anticuerpo frente al epítipo AU5. B) Las células fueron tratadas con vehículo (DMSO), 60  $\mu$ M PGA<sub>1</sub> ó 10  $\mu$ M 15d-PGJ<sub>2</sub>, durante 24 horas. Se monitorizó la actividad enzimática de AKR1B10 en las fracciones S100 resultantes. En el panel inferior se muestran los niveles de proteína AKR1B10 en las distintas condiciones, analizados mediante Western blot con anticuerpo frente al epítipo AU5.

B



## 11.- ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE OTRAS AKR POR PGA<sub>1</sub>-B EN CÉLULAS COS-7

La proteína AKR1B10 comparte un alto grado de identidad de secuencia con las proteínas AKR1B1 Y AKR1B8, presentes en humano y ratón respectivamente, tal y como se muestra en el alineamiento de las secuencias (Figura 10). Nos interesó comprobar si la PGA<sub>1</sub>-B podría unirse a estas proteínas expresadas en las células COS-7. Para ello se transfectaron las células COS-7 con los vectores de expresión de las proteínas AKR1B1, AKR1B8 o AKR1B10, y se trataron posteriormente con PGA<sub>1</sub>-B. Como se observa en la figura 32, la PGA<sub>1</sub>-B se une a la proteína AKR1B8 en un grado similar al que se une a la proteína AKR1B10. Sin embargo, en las fracciones procedentes de células transfectadas con el vector de expresión de la proteína AKR1B1, no se detectó señal de biotina a la altura a la que migra dicha proteína, lo que indica que en estas condiciones la PGA<sub>1</sub>-B no se une a la AKR1B1.



**Figura 32.- Modificación de proteínas AKR por PGA<sub>1</sub>-B.** Las células COS-7 fueron transfectadas con los vectores pCMV6-XL5-AKR1B1, B8 y B10, y posteriormente tratadas con vehículo (DMSO) ó 60  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>-B durante 24 horas. Las fracciones S100 resultantes fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina peroxidasa, anti-AKR y anti-AKR1B10.

## 12.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN E INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR PGA<sub>1</sub> EN UN MODELO CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

La proteína AKR1B10 tiene una gran importancia fisiopatológica, principalmente porque se encuentra en niveles muy elevados en distintos tipos de tumores humanos, entre ellos, en adenocarcinoma de pulmón, y se ha propuesto que contribuye a su desarrollo (Fukumoto et al., 2005). Con objeto de explorar la relevancia fisiopatológica de la modificación e inhibición de AKR1B10 por PGA<sub>1</sub>, se utilizó un

modelo celular de adenocarcinoma de pulmón humano, las células A549. Se ha descrito que esta línea celular expresa altos niveles de la proteína AKR1B10, además de otras proteínas de la familia AKR en menor proporción, como la isoforma AKR1B1 y otros miembros de la subfamilia AKR1C (Ebert et al., 2011).

Los resultados obtenidos mediante la cromatografía en neutravidina-agarosa (Figura 12B) indicaron que la proteína AKR1B10 podría ser modificada por PGA<sub>1</sub>-B en las células A549. Con objeto de analizar las repercusiones de esta modificación sobre la biología de estas células tumorales, en primer lugar se analizó el efecto de PGA<sub>1</sub> sobre la actividad enzimática de AKR1B10 en dichas células.

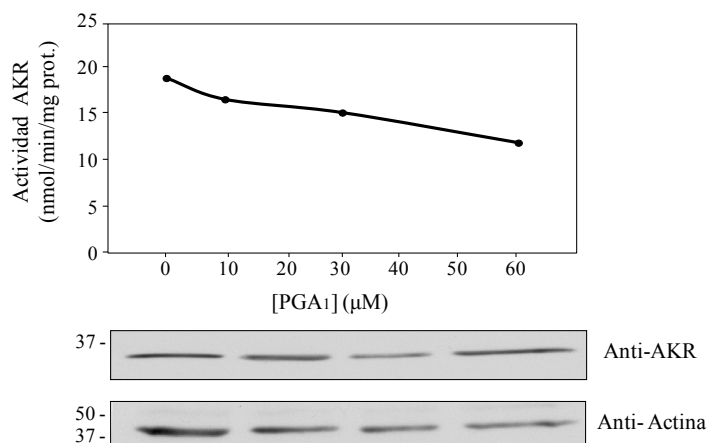
Como se mencionó anteriormente, aunque la AKR1B10 es mayoritaria, las células A549 expresan otras proteínas de la familia de las AKR. Puesto que el DL-gliceraldehído es sustrato común de varios miembros de esta familia, por ejemplo, de AKR1B1, el consumo de NADPH monitorizado en los ensayos de actividad en las células A549, se consideró como actividad AKR total.

Como se observa en la figura 33A, la PGA<sub>1</sub> produjo una disminución de la actividad AKR en las células A549 dependiente de la concentración, sin dar lugar a cambios en los niveles de AKR. A continuación, se analizó si la PGA<sub>1</sub>-B podría reproducir el efecto inhibitorio de la PGA<sub>1</sub> observado sobre la actividad AKR en estas células. Los resultados obtenidos (Figura 33B) muestran que a 60  $\mu$ M, la PGA<sub>1</sub>-B inhibió significativamente la actividad AKR en las células A549 en un grado semejante a la PGA<sub>1</sub>. Además, la presencia de PGA<sub>1</sub>-B tampoco produjo cambios en la expresión de AKR (Panel inferior figura 33B). Estos resultados demuestran que la PGA<sub>1</sub>-B reproduce los efectos de la PGA<sub>1</sub> sobre la actividad AKR en las células A549.

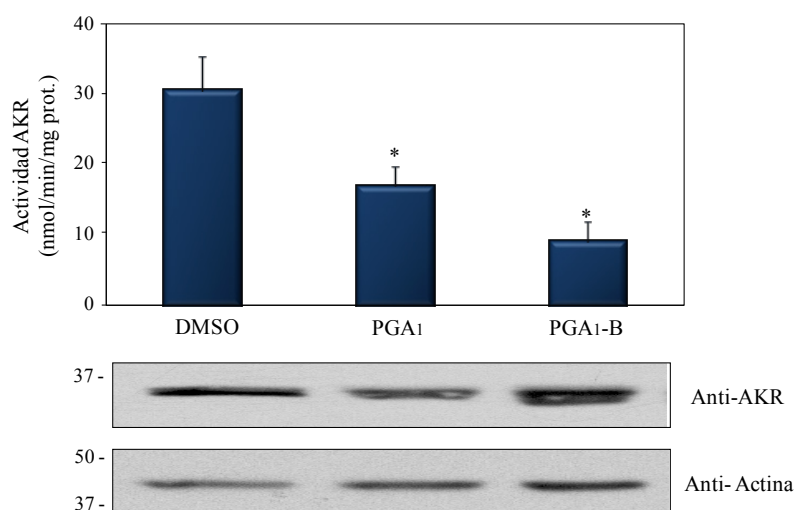
### **12.1.- Efecto de los niveles de GSH en la modificación e inhibición de proteínas AKR por PGA<sub>1</sub> en las células A549**

Se ha descrito en un gran número de tumores que los sistemas de detoxificación y de respuesta antioxidante están altamente activados. Los niveles de GSH, la principal molécula antioxidante en la célula, están muy elevados en este tipo de situaciones patológicas (Tew, 2007).

A



B



**Figura 33.- Inhibición de proteínas AKR por PGA<sub>1</sub> y PGA<sub>1</sub>-B en las células A549.**

Se monitorizó la actividad enzimática AKR en las fracciones S100 procedentes de las células A549 tratadas con vehículo (DMSO) o (A) con PGA<sub>1</sub> a las concentraciones que se indica; (B) con 60 μM PGA<sub>1</sub> o PGA<sub>1</sub>-B, durante 24 horas. Se muestra la media de dos experimentos en A, y la media  $\pm$  error estándar de 5 experimentos en B. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición control. En los paneles inferiores se muestran los niveles de AKR y actina en cada condición, obtenidos mediante Western blot.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se demostró que los niveles de GSH modulan la modificación de proteínas por cyPG tanto *in vitro* como en células (Gayarre et al., 2006; Gayarre et al., 2005).

Dadas estas evidencias, se procedió al estudio del efecto de los niveles de GSH en la modificación e inhibición de la proteína AKR1B10 por  $\text{PGA}_1$  en las células A549. Para reducir los niveles de GSH, se utilizó el compuesto BSO, un inhibidor específico de la  $\gamma$ -GCS, la enzima limitante de la síntesis de GSH.

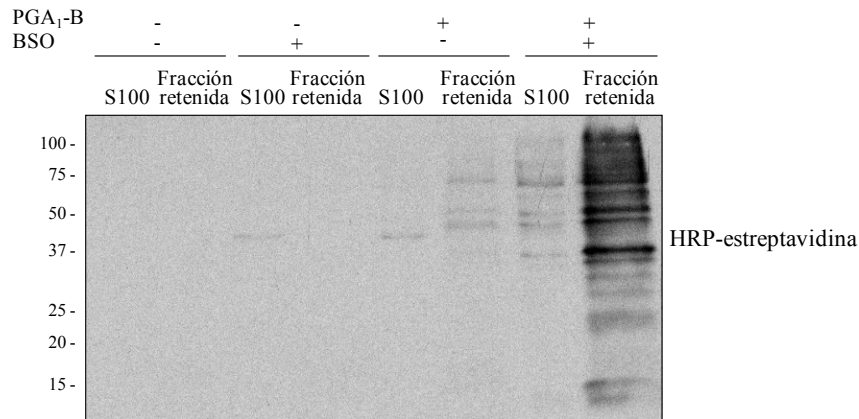
Primeramente, las células A549 se trataron con BSO y posteriormente con  $\text{PGA}_1$ -B. A continuación, las fracciones S100 procedentes de estas células se sometieron a cromatografía en neutravidina-agarosa.

Como se observa en la figura 34A, la retención de proteínas celulares totales en la resina de neutravidina fue drásticamente mayor cuando las células se trataron con BSO, previamente al tratamiento con  $\text{PGA}_1$ -B. Además, la retención de proteínas AKR también fue mayor en estas condiciones, en comparación con la muestra equivalente sin BSO (Figura 34B).

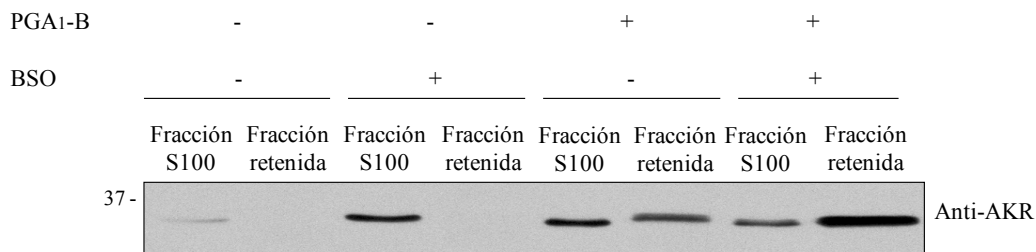
Posteriormente, se analizó el efecto de la disminución de los niveles de GSH sobre la actividad AKR y el efecto inhibidor de la  $\text{PGA}_1$  (Figura 34C). El tratamiento de las células únicamente con BSO produjo una disminución de la actividad AKR en comparación con el control. Además, la presencia de BSO provocó un incremento de la inhibición de la actividad AKR tanto por  $\text{PGA}_1$  como por su análogo biotinilado. Dicho aumento fue significativo en el caso de  $\text{PGA}_1$ . Asimismo, como se observa en los resultados obtenidos mediante Western blot (Panel inferior figura 34C), los niveles de proteínas AKR no resultaron afectados en ninguna de las condiciones ensayadas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el mantenimiento del estado redox en la célula, regulado principalmente por la ruta metabólica de síntesis de GSH, es importante para la actividad enzimática de las proteínas AKR. Además, la disminución de los niveles de GSH en las células A549 favorecen la modificación de proteínas por  $\text{PGA}_1$ -B, y concretamente, la modificación e inhibición de proteínas AKR por  $\text{PGA}_1$ .

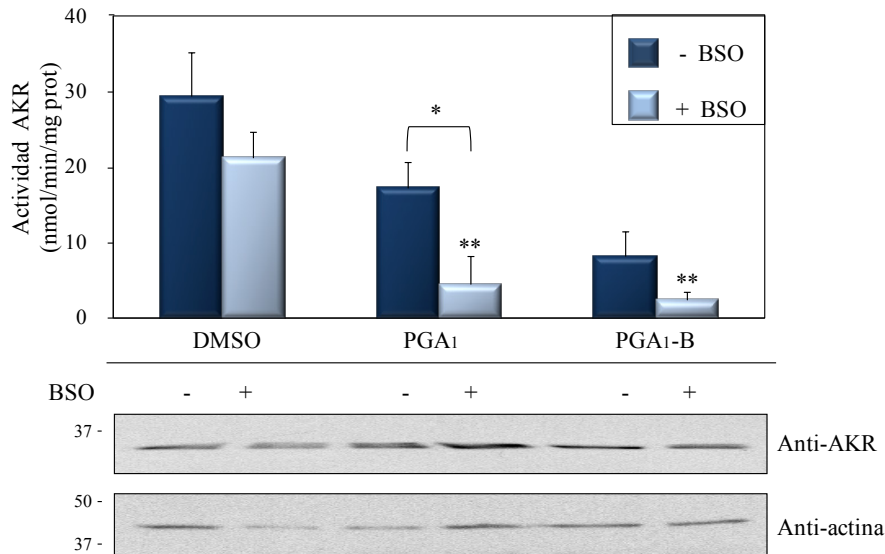
A



B



C



**Figura 34.- Efecto de los niveles de GSH sobre la modificación e inhibición de proteínas AKR por PGA<sub>1</sub> en las células A549.** Las células A549 fueron incubadas con 50  $\mu$ M BSO, durante 16 horas, y posteriormente fueron tratadas con 60  $\mu$ M PGA<sub>1</sub> o PGA<sub>1</sub>-B, durante 24 horas. A) Las fracciones S100 procedentes de dichas células fueron sometidas a cromatografía en resina de neutravidina-agarosa. Las fracciones S100 y las fracciones retenidas fueron analizadas mediante Western blot con A) estreptavidina peroxidasa o B) anti-AKR. C) Se monitorizó la actividad enzimática AKR en las fracciones S100 resultantes. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición que se indica. \*\*  $p \leq 0,01$  con respecto a la condición control. En los paneles inferiores se muestran los niveles de AKR y de actina en cada condición, obtenidos mediante Western blot.

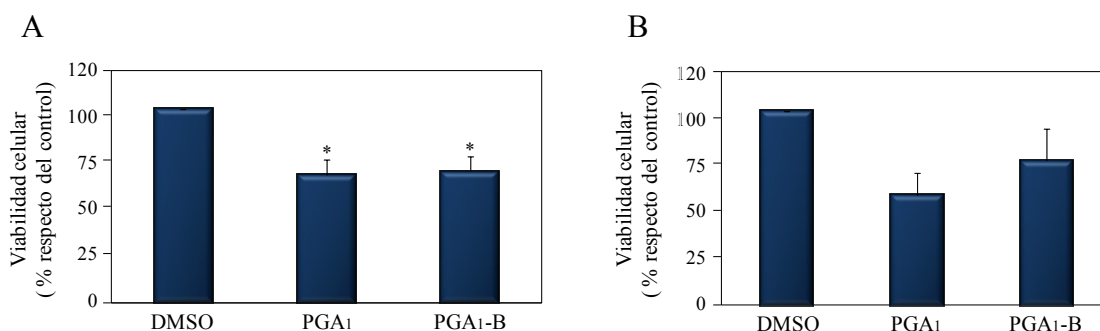
### 13.- EFECTOS DE PGA<sub>1</sub> EN LAS CÉLULAS A549

Se ha descrito ampliamente que las cyPG, y concretamente las PGAs, producen efectos antitumorales y antiproliferativos en numerosos tipos de modelos experimentales. Estos efectos se producen a través de la interacción con diferentes moléculas reguladoras de rutas metabólicas, apoptosis, ciclo celular, respuesta antioxidante, etc. (Díez-Dacal and Pérez-Sala, 2012).

Teniendo en cuenta estas evidencias, se procedió a explorar el efecto de PGA<sub>1</sub> sobre la biología de las células A549.

#### 13.1.- Efecto de PGA<sub>1</sub> sobre la viabilidad de las células A549

En primer lugar, se comprobó el efecto de PGA<sub>1</sub> y su análogo biotinilado en la viabilidad/proliferación de las células A549. Para ello, se realizaron dos ensayos colorimétricos diferentes, en los que se utilizaron el reactivo MTT o el reactivo AlamarBlue. Como se observa en la figura 35, tanto la PGA<sub>1</sub> como la PGA<sub>1</sub>-B produjeron una disminución de entre el 30 y el 40 % de la viabilidad celular con respecto a las células control. Estos resultados demuestran una vez más que la PGA<sub>1</sub>-B reproduce los efectos de la PG no biotinilada en las células A549.

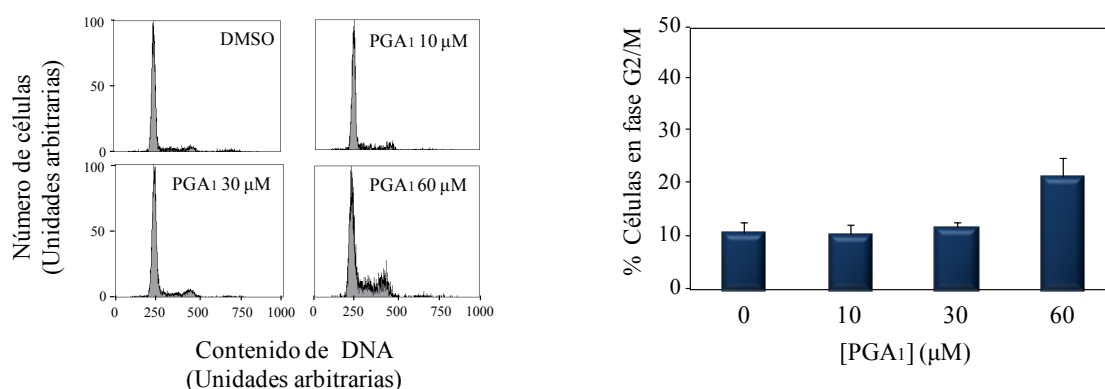


**Figura 35.- Ensayo de viabilidad de las células A549.** Las células A549 se trataron con vehículo (DMSO) ó 60  $\mu$ M PGA<sub>1</sub> o PGA<sub>1</sub>-B durante 24 horas. Posteriormente se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando los reactivos MTT (A) y AlamarBlue (B). Se muestra el % de viabilidad celular con respecto al control. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición control.



### 13.2.- Efecto de $\text{PGA}_1$ sobre el ciclo celular de las células A549

A continuación se analizó el efecto de la  $\text{PGA}_1$  sobre el ciclo celular de las A549 mediante citometría de flujo. Como se observa en la figura 36, el tratamiento con 10 y 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{PGA}_1$  no produjo ningún efecto sobre el ciclo celular, sin embargo, a 60  $\mu\text{M}$ , la población de células en fase G2/M del ciclo celular se duplicó con respecto a la muestra control.



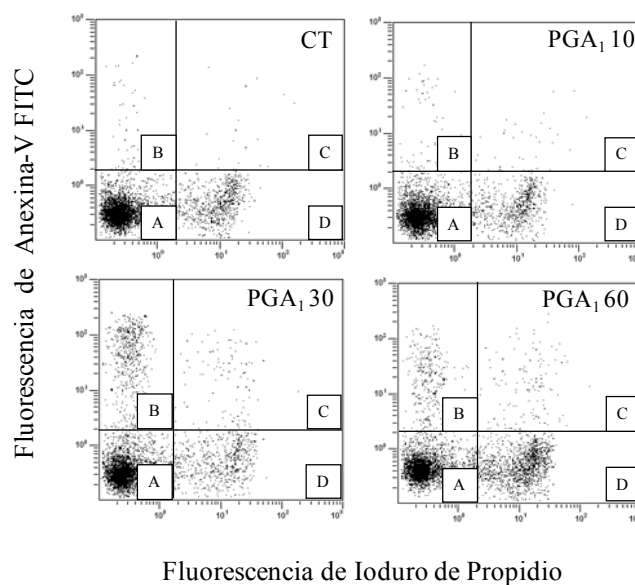
**Figura 36.- Efecto de  $\text{PGA}_1$  sobre la distribución del ciclo celular de células A549.** Las células A549 se trataron con vehículo (DMSO) o  $\text{PGA}_1$  a las concentraciones que se indican durante 16 horas. Posteriormente las células se procesaron tal y como se indica en el apartado de “Material y Métodos”, y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo. A la izquierda se muestra el perfil del ciclo celular en cada condición de un experimento representativo. A la derecha se muestra el % de células en fase G2/M del ciclo celular. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos.

### 13.3.- Efecto de $\text{PGA}_1$ sobre la inducción de apoptosis en las células A549

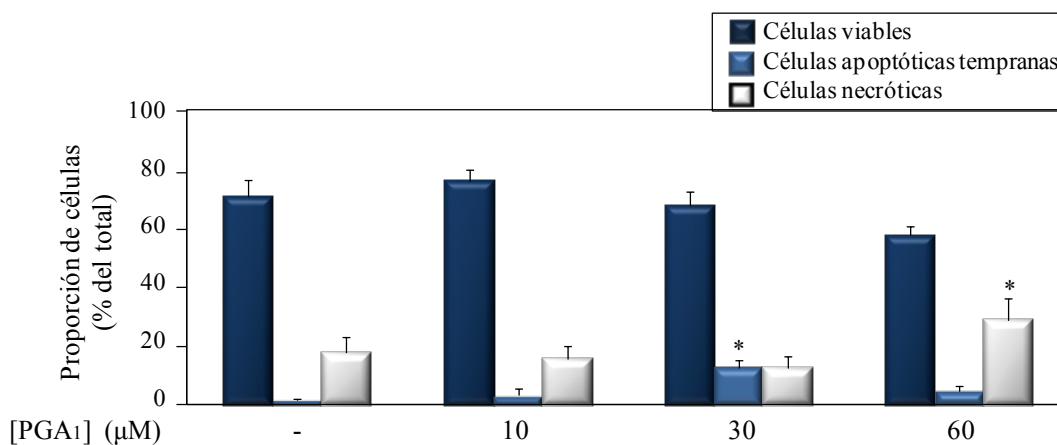
La exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática es un evento característico que se produce en la fase temprana de la muerte celular por apoptosis. Este fenómeno puede ser fácilmente detectado mediante el marcaje de las células con un conjugado fluorescente de Anexina-V, una proteína con una elevada afinidad por la fosfatidilserina.

Para estudiar el efecto de la  $\text{PGA}_1$  en la apoptosis, las células A549 se trataron previamente con dosis crecientes de  $\text{PGA}_1$ , y posteriormente la unión de Anexina-V fluorescente y la captación de IP, indicativa de la pérdida de la integridad de la membrana, se cuantificaron mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 37, el tratamiento de las células con  $\text{PGA}_1$  produjo una disminución en la población de células viables (Figura 37A, cuadrante A) de forma dependiente de la

A



B



**Figura 37.- Efecto de  $\text{PGA}_1$  sobre la apoptosis en las células A549.** Las células A549 se trataron con vehículo (DMSO) o  $\text{PGA}_1$  a las concentraciones que se indican durante 16 horas. Posteriormente las células se procesaron tal y como se indica en el apartado de “Material y Métodos”, y se analizó la unión de Anexina-V y la captación de IP mediante citometría de flujo. A) Se muestra una imagen de la distribución de la población celular en cada condición de un experimento representativo. A: células viables; B: células apoptóticas tempranas; C: células apoptóticas tardías; D: células necróticas. B) Se muestra el % de células viables, apoptóticas tempranas y necróticas respecto a la población total en cada condición. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. \* $p \leq 0,05$  con respecto a la condición control.

concentración de la PG. Además, tras el tratamiento de las células con 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{PGA}_1$ , se produjo un aumento significativo en la proporción de células apoptóticas tempranas (Figura 37A, cuadrante B), caracterizadas por ser Anexina-V positivas y IP negativas. Por otro lado, la proporción de células necróticas (Figura 37A, cuadrante D), caracterizadas por ser Anexina-V negativas y IP positivas, se incrementó significativamente con 60  $\mu\text{M}$  de  $\text{PGA}_1$ .

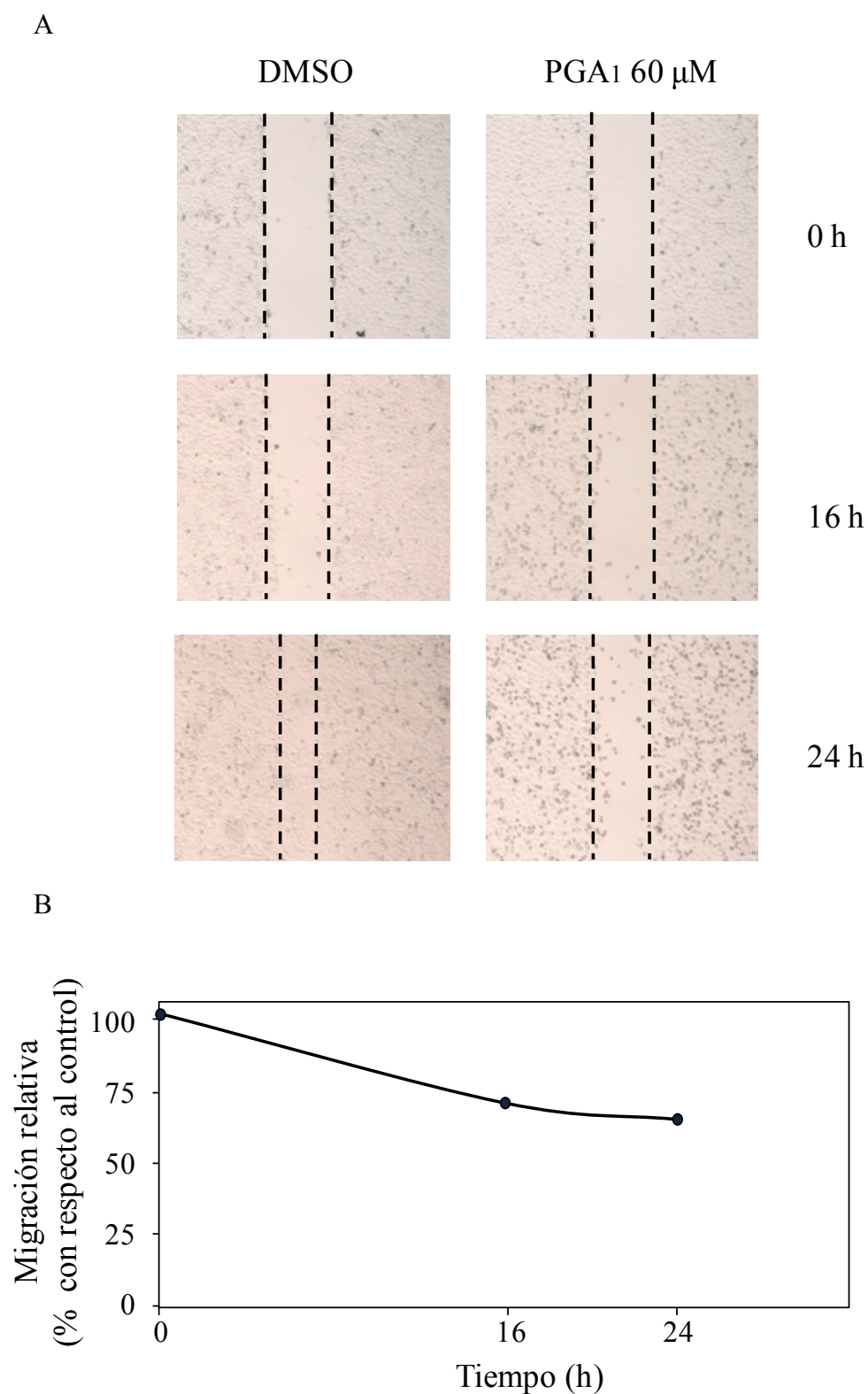
En conjunto, estos resultados indican que la  $\text{PGA}_1$  disminuye la viabilidad celular de las células A549. Esta disminución en la viabilidad celular está asociada con la inducción de apoptosis a la concentración de 30  $\mu\text{M}$ , y con muerte por necrosis a la concentración de 60  $\mu\text{M}$  de  $\text{PGA}_1$ .

#### **14.- EFECTO DE LA $\text{PGA}_1$ SOBRE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LAS CÉLULAS A549**

El proceso de metástasis consiste en el desplazamiento de las células desde un tumor primario a otros órganos, donde proliferan y forman nuevos tumores. La capacidad de una célula de metastatizar depende su capacidad de proliferación, supervivencia, invasión, etc. Estos procesos determinan en la mayoría de los casos la malignidad de un tumor, por lo que es de gran importancia el estudio de los factores que están implicados para el desarrollo de tratamientos eficaces (Fidler, 2002).

##### **14.1.- Efecto de $\text{PGA}_1$ sobre la migración de las células A549**

La capacidad de migración de una célula es una faceta muy importante en el proceso de metástasis. Mediante un experimento *in vitro* basado en la reparación de la “herida” en una monocapa de células, se exploró el efecto de  $\text{PGA}_1$  sobre la capacidad de migración de las células A549. Como se observa en la figura 38, el tratamiento con  $\text{PGA}_1$  inhibió la capacidad de migración de las células A549. La diferencia en la anchura de la “herida” entre las células tratadas con  $\text{PGA}_1$  y las células control fue más relevante al cabo de 24 horas de tratamiento.



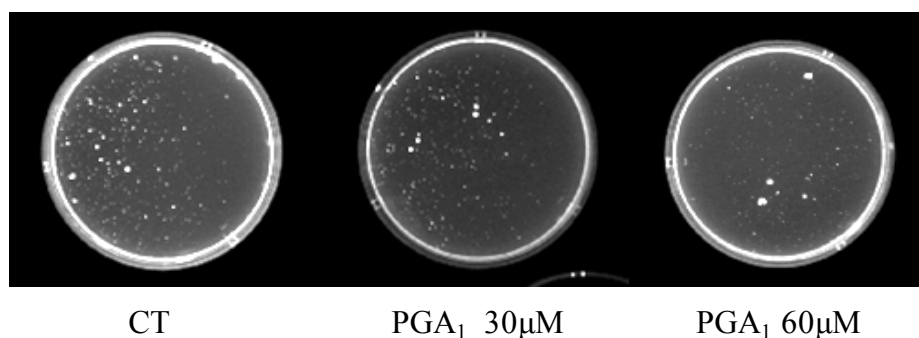
**Figura 38.- Efecto de PGA<sub>1</sub> en la migración de las células A549.** Se realizó una “herida” con una punta de pipeta en la monocapa de células A549 confluentes. Posteriormente las células se trataron con vehículo (DMSO) ó 60  $\mu$ M PGA<sub>1</sub> en medio completo. Se tomaron imágenes de la “herida” a las 16 y 24 horas posteriores al tratamiento. En (A) se muestra una imagen representativa de cada condición analizada. En (B) se muestra el promedio de la distancia migrada en cada caso. Los resultados que se muestran son representativos de 3 experimentos.

#### 14.2.- Efecto de la $\text{PGA}_1$ sobre el crecimiento de colonias en agar de A549

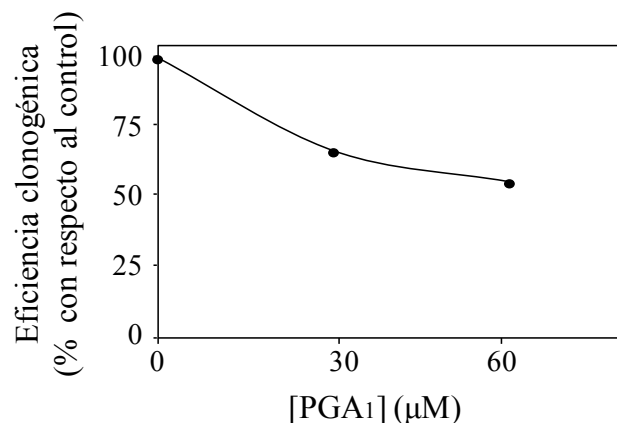
El ensayo de crecimiento de colonias en agar es una medida *in vitro* de la capacidad de las células de formar colonias en ausencia de adhesión. Este ensayo se utiliza desde hace décadas, y es una aproximación que permite explorar el potencial tumorigénico de una célula intacta o tras la administración de un tratamiento (Franken et al., 2006).

Se analizó el efecto de  $\text{PGA}_1$  en la capacidad de crecimiento en agarosa de las células A549. En ensayos previos de viabilidad observamos que el efecto citotóxico de la  $\text{PGA}_1$  se atenuaba a partir de las 48 horas de tratamiento. Para evitar esta posibilidad en los experimentos que se exponen a continuación, las células se trataron con  $\text{PGA}_1$  cada 48 horas.

A



B



**Figura 39.- Efecto de la  $\text{PGA}_1$  en el crecimiento de colonias en agarosa de las células A549.** Las células A549 sembradas en agarosa preparada con medio completo se trataron con vehículo (DMSO) o  $\text{PGA}_1$  a las concentraciones que se indican, 3 veces por semana, durante 3 semanas. En (A) se muestra una imagen representativa de cada condición. En (B) se muestra el % de colonias formadas con respecto al control. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

Como se observa en la figura 39, la capacidad de formación de colonias en agarosa de las células A549 se redujo hasta un 50% cuando las células fueron tratadas periódicamente con  $\text{PGA}_1$  a 60  $\mu\text{M}$ .

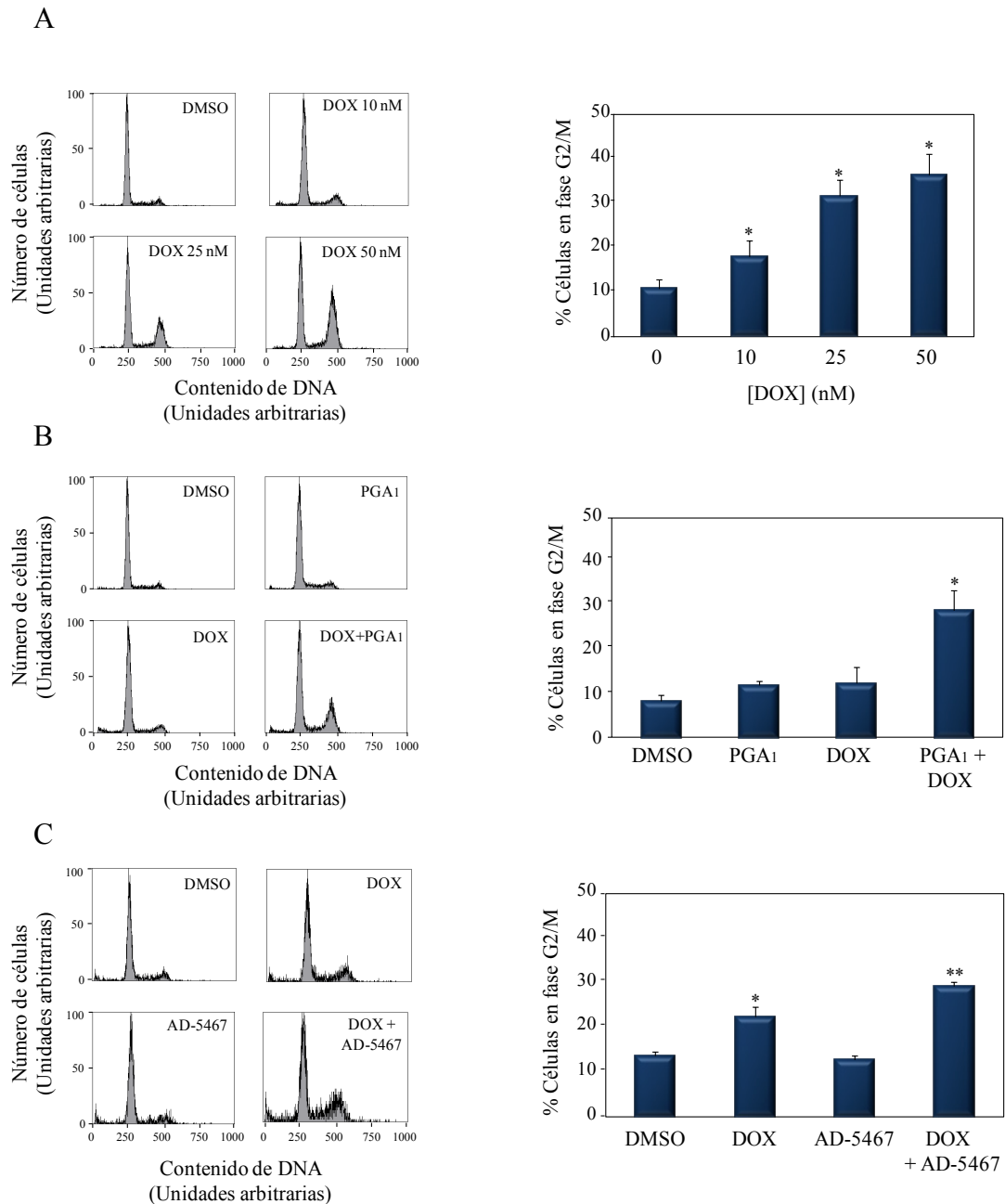
Conjuntamente, estos resultados ponen de manifiesto el potencial antitumoral de  $\text{PGA}_1$  en un modelo celular de adenocarcinoma de pulmón humano.

### **15.- EFECTO DE $\text{PGA}_1$ EN LA QUIMIORRESISTENCIA DE LAS CÉLULAS A549 AL FÁRMACO ANTITUMORAL DOXORRUBICINA**

La DOX es un fármaco antitumoral ampliamente utilizado que actúa principalmente a través de su interacción con la enzima top-II (Kellner et al., 2002). La proteína AKR1B10 es capaz de metabolizar la DOX a DOX-OL, el cual es menos activo y puede ser posteriormente exportado de la célula mediante proteínas de resistencia a fármacos (MDR) (Martin et al., 2006).

Una vez comprobado que la  $\text{PGA}_1$  inhibe la actividad AKR en las células A549, se procedió a explorar si este efecto podría contribuir a mejorar los efectos producidos por DOX, ya que la proteína AKR1B10 es la AKR más abundante expresada en las células A549.

En primer lugar, se analizó el ciclo celular de las A549 mediante citometría de flujo en presencia de concentraciones crecientes de DOX. Como se observa en la figura 40A, el tratamiento con DOX produjo un aumento en la proporción de células en fase G2/M, dependiente de la concentración de DOX. A continuación, se analizó el ciclo celular de las A549 en presencia de DOX y  $\text{PGA}_1$  (Figura 40B). Se comprobó que el tratamiento conjunto con DOX y  $\text{PGA}_1$  produjo un aumento significativo en la proporción de células en fase G2/M del ciclo celular, en comparación con el tratamiento con los dos compuestos por separado. Asimismo, cuando se trataron las células con DOX junto con un inhibidor específico de la aldosa reductasa, AD-5467 (Figura 40C), también se produjo un aumento significativo en la proporción de células en fase G2/M del ciclo celular, con respecto al producido por la DOX por sí sola.



**Figura 40.- Efecto del tratamiento con DOX en combinación con PGA<sub>1</sub> o AD-5467 sobre el ciclo celular de células A549.** Se analizó el ciclo celular por citometría de flujo de células A549 tratadas durante 16 h con: (A) vehículo (DMSO) o DOX a las concentraciones que se indican; (B) 10 nM de DOX en ausencia o presencia de 30  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>; (C) 10 nM de DOX en ausencia o presencia de 30  $\mu$ M AD-5467. A la izquierda se muestra la distribución del ciclo celular de un experimento representativo en cada caso, y a la derecha el % de células en fase G2/M del ciclo celular con respecto al control. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. \*  $p \leq 0,05$  ó \*\*  $p \leq 0,01$  con respecto a la condición control.

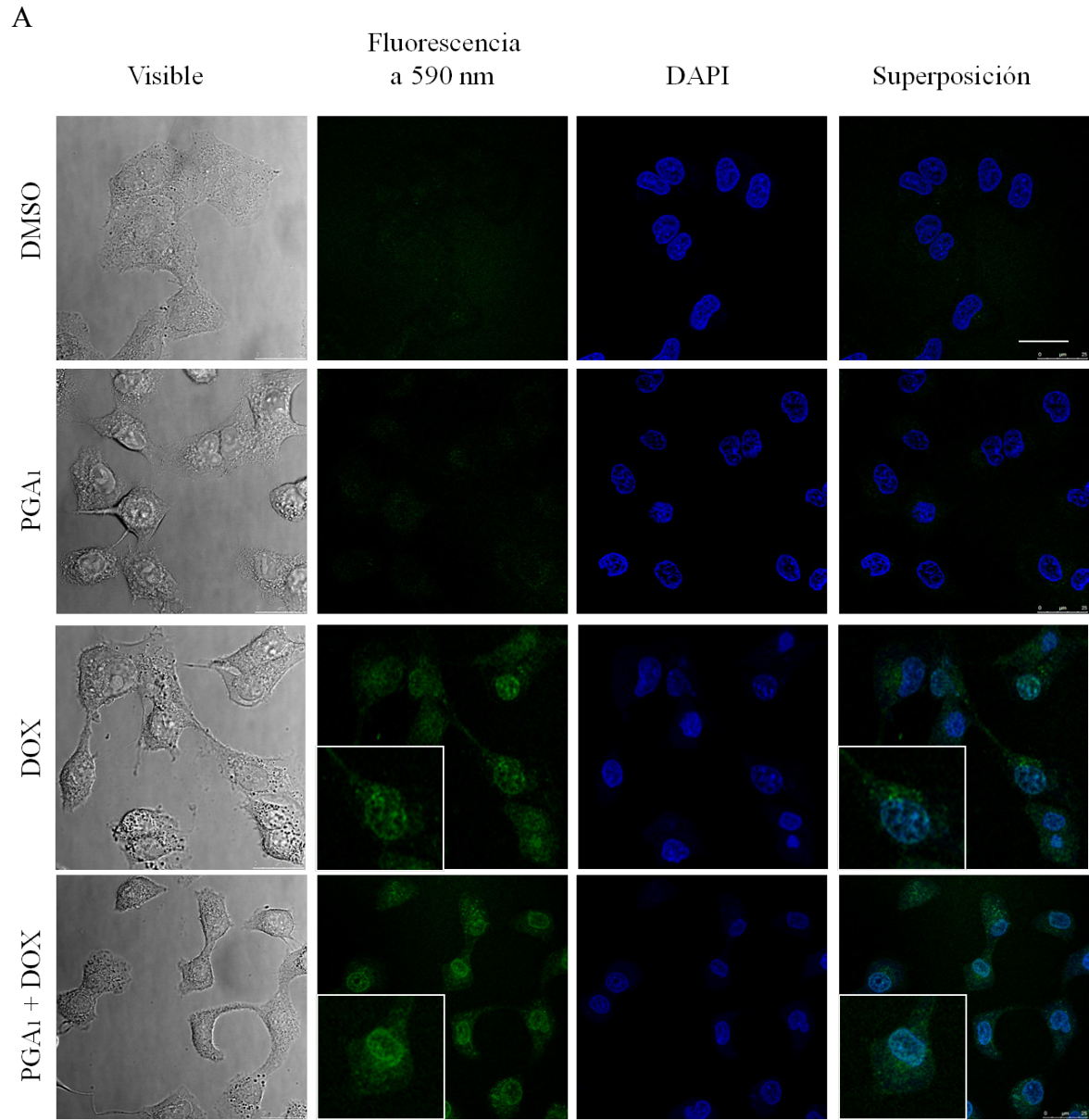
Seguidamente, se analizó el efecto de  $\text{PGA}_1$  sobre la acumulación de DOX en el interior de las células A549. En primer lugar, las células tratadas con  $\text{PGA}_1$  y/o DOX se analizaron mediante microscopía confocal. Como se observa en la figura 41A, la DOX presenta una distribución difusa en la célula, con una mayor acumulación en el núcleo. Tras el tratamiento con  $\text{PGA}_1$  y DOX conjuntamente, se observa claramente un aumento de la acumulación de DOX, también con predominio nuclear.

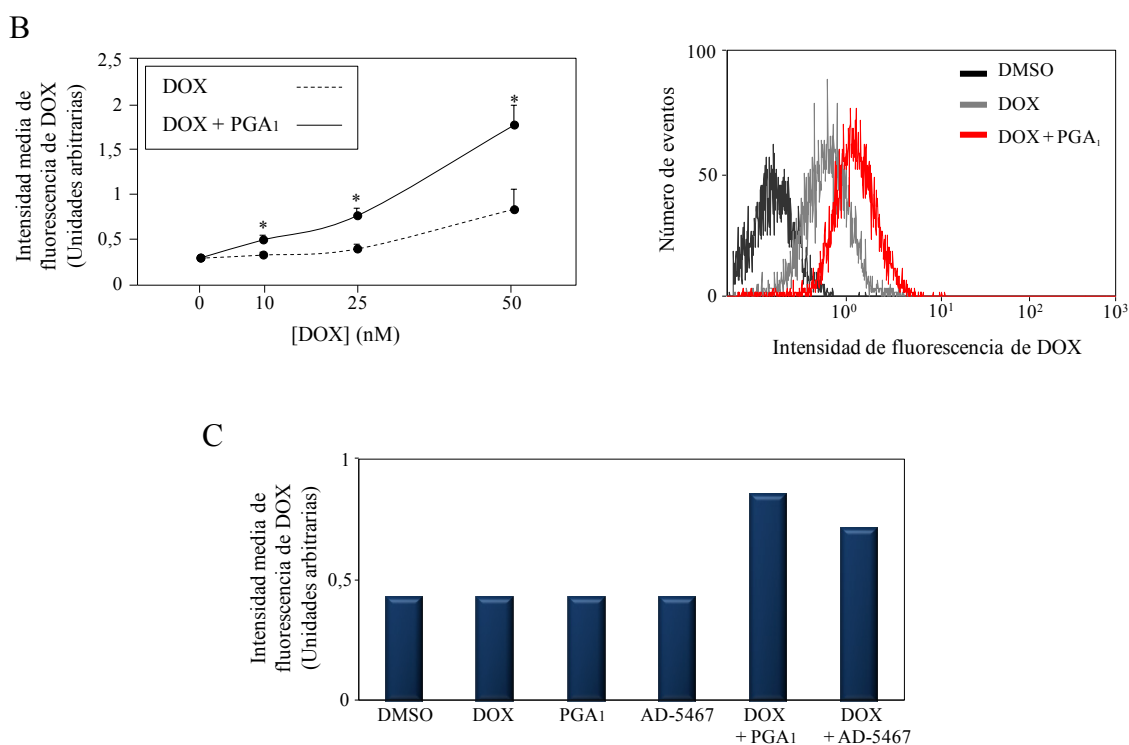
Con objeto de cuantificar estas observaciones, las células A549 tratadas con DOX y  $\text{PGA}_1$  se analizaron mediante citometría de flujo (Figura 41B). Como se muestra en los perfiles representativos de los paneles, esta técnica permitió observar claramente el incremento de la intensidad de fluorescencia en la población de células tras la incubación con DOX de forma dependiente de la concentración. La intensidad de fluorescencia asociada a las células aumentó con todas las concentraciones de DOX empleadas. Además, tras el tratamiento conjunto con  $\text{PGA}_1$  se produjo un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia asociado a las células A549 con respecto al inducido por la DOX sola.

A continuación, se analizó la intensidad de fluorescencia después del tratamiento con DOX junto con el inhibidor de la aldosa reductasa, AD-5467 (Figura 41C). Este inhibidor también indujo un aumento en la acumulación de DOX de magnitud similar al observado tras el tratamiento conjunto con  $\text{PGA}_1$ .

Estos resultados revelan que la  $\text{PGA}_1$  potencia la acumulación de DOX en el interior celular, así como la parada del ciclo celular en fase G2/M inducida por este compuesto. El hecho de que estos efectos sean reproducidos por un inhibidor específico de la aldosa reductasa, el AD-5467, sugiere que la potenciación de los efectos de DOX por  $\text{PGA}_1$  podrían estar en parte mediados por la inhibición de la proteína AKR1B10 por  $\text{PGA}_1$ .







**Figura 41.- Efecto de la PGA<sub>1</sub> en la acumulación de DOX en las células A549.** A) Las células A549 fueron tratadas con vehículo (DMSO) ó 250 nM DOX, en ausencia o presencia de 30  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>, durante 16 horas. Posteriormente, las células se fijaron con PFA al 4%, y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran imágenes de cada condición tomadas en el microscopio confocal. Las imágenes corresponden a una única sección tomada en una posición z intermedia. La barra representa 25  $\mu$ m. Recuadrado en blanco se muestra un aumento de una célula representativa en cada condición. B) Las células A549 se trataron con vehículo (DMSO) o DOX a las concentraciones que se indican, en ausencia o presencia de 30  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>. Finalmente se analizó la intensidad de fluorescencia de DOX mediante citometría de flujo. A la derecha se muestran los resultados de un experimento representativo con 50 nM DOX y a la izquierda se muestra la media de la intensidad de fluorescencia de DOX en las diferentes condiciones analizadas. C) Las células A549 se trataron con vehículo (DMSO) o con DOX 25 nM, en ausencia o presencia de 30  $\mu$ M PGA<sub>1</sub> o de 30  $\mu$ M AD-5467 y se analizó la intensidad de fluorescencia de DOX. En B, los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos. En A y C, se muestran los resultados de un experimento representativo. \*  $p \leq 0,05$  con respecto a la condición sin PGA<sub>1</sub> en cada caso.



## **Discusión**



Las PGAs son mediadores lipídicos altamente reactivos, con efectos antineoplásicos y antiinflamatorios. Estos compuestos llevan a cabo sus acciones biológicas principalmente a través de su interacción con proteínas celulares. Esta interacción es particularmente selectiva, dependiendo de diversos factores. La identificación y caracterización de nuevas dianas celulares de las cyPG, y concretamente de las PGAs, es de suma importancia para conocer más profundamente las acciones y mecanismos de estos mediadores en el organismo. Además, el carácter antineoplásico de estos agentes aumenta su importancia, ya que podrían formar parte de nuevos tratamientos en las terapias antitumorales.

En los últimos años, el desarrollo y el perfeccionamiento de los abordajes proteómicos ha permitido la identificación de nuevas dianas celulares de las PGAs, además de, en muchos casos, la determinación del sitio de unión específico dentro de la proteína diana (Díez-Dacal and Pérez-Sala, 2012).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se identificaron dos proteínas pertenecientes a la superfamilia de las AKR como dianas selectivas de la  $PGA_1$ : la proteína aldosa reductasa o AKR1B1 y la proteína AKR1B10, la cuales comparten un elevado grado de identidad de secuencia entre ellas, y tienen importantes implicaciones fisiopatológicas. A partir de estas observaciones, se llevó a cabo la caracterización de la modificación de estas proteínas por  $PGA_1$ , y el estudio de las repercusiones fisiopatológicas de la interacción, utilizando en cada caso, abordajes diferentes.

## **1.- INTERACCIÓN DE LA $PGA_1$ CON LA PROTEÍNA AKR1B1**

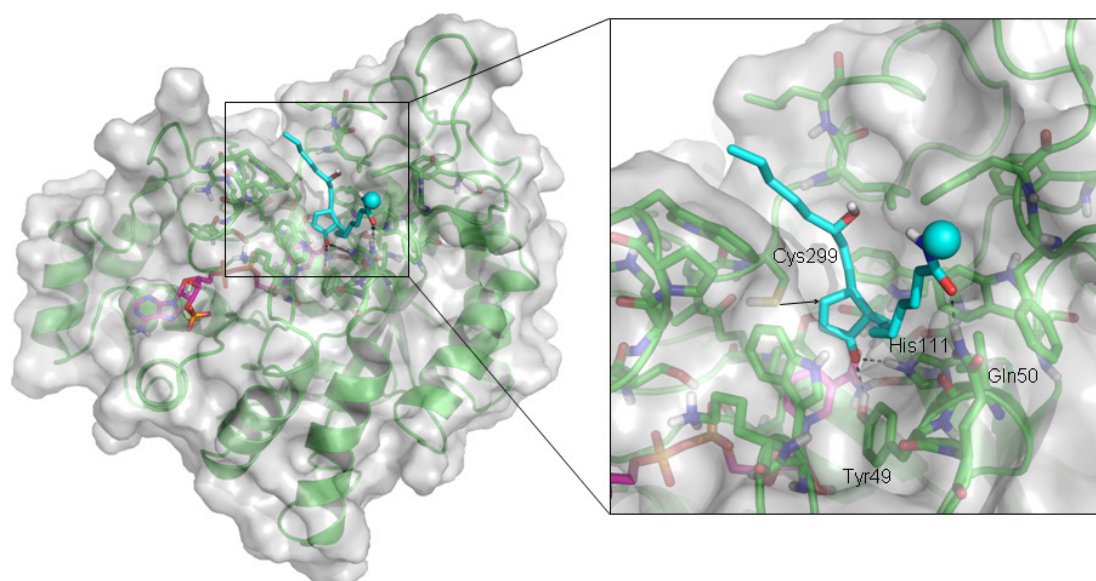
La proteína AKR1B1 cataliza el paso limitante del metabolismo de la glucosa por la ruta de los polioles (Figura 6). Desde hace décadas, esta enzima ha sido objeto de estudio debido a su implicación en el desarrollo de las complicaciones diabéticas secundarias (Petrash, 2004). Además, recientemente se ha descrito que esta proteína también contribuye al desarrollo de patologías inflamatorias tales como sepsis, asma, aterosclerosis o cáncer (Ramana, 2011). Es por lo tanto de gran importancia, el desarrollo de inhibidores de la proteína AKR1B1 para el tratamiento de complicaciones diabéticas secundarias, así como para el tratamiento y la prevención de patologías inflamatorias.

### 1.1.- Modificación de la proteína AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>

En este trabajo hemos demostrado que la proteína AKR1B1 constituye una diana para la modificación covalente por PGA<sub>1</sub>. Mediante técnicas de MS por MALDI-TOF, comprobamos que la PGA<sub>1</sub> se une a la proteína recombinante AKR1B1, en una proporción de una molécula de PG por molécula de proteína (Figura 13). Además, para profundizar en el conocimiento de la unión de la PGA<sub>1</sub> a la enzima AKR1B1, se realizó un modelado molecular con objeto de predecir qué tipo de interacciones podrían llevarse a cabo, así como los residuos importantes en esas interacciones. El modelado molecular fue realizado por el profesor Federico Gago, de la Universidad de Alcalá de Henares. Las imágenes generadas se muestran en la figura 42. El modelo predice que la PGA<sub>1</sub> se introduce en el centro activo de la enzima unida a NADP<sup>+</sup>. En la orientación con la que se introduce la PGA<sub>1</sub>, enfrenta el grupo ceto hacia el residuo His110 protonado. La distancia es favorable para la formación de un enlace de hidrógeno. La His110 además, orienta la ciclopentenona de forma que el carbono electrófilo queda a una distancia de interacción también favorable del residuo de Cys298, produciéndose una reacción de Michael, que da lugar a un aducto covalente. Además, estas interacciones podrían resultar favorecidas por la formación de otro enlace de hidrógeno entre el protón de la cadena lateral del residuo Tyr48 y el carbonilo de la ciclopentenona. También se establecen interacciones por enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales de la PGA<sub>1</sub> con el esqueleto peptídico de la enzima (Díez-Dacal et al., 2011).

Las predicciones del modelo molecular de las interacciones entre la PGA<sub>1</sub> y la proteína AKR1B1 concuerdan con el modo de interacción de otros inhibidores con la proteína. Por ejemplo, el compuesto zopolrestat se introduce en el centro activo de la enzima estableciendo interacciones mediante puentes de hidrógeno con los residuos Tyr48 e His110, además de con otros residuos también presentes en el centro activo (Steuber et al., 2006; Wilson et al., 1993). Otros compuestos sintéticos derivados del pirrolidifluorofenol, algunos de los cuales mostraron una elevada actividad inhibitoria selectiva frente a la AKR1B1, establecen también interacciones mediante puentes de hidrógeno con los residuos Tyr48 e His110, entre otras interacciones (Chatzopoulou et al., 2011). El inhibidor sorbinil, también establece interacciones con la His110 y la Tyr48 (Urzhumtsev et al., 1997). Además, la mutación del residuo de Cys298 del centro activo de la proteína AKR1B1 por serina disminuyó su susceptibilidad a la inhibición

por sorbinil, lo que indica que este compuesto también podría interaccionar con la Cys298 (Petrash et al., 1992).



**Figura 42.- Modelo molecular de la interacción de la  $\text{PGA}_1$  con el centro activo de la enzima AKR1B1.** Representación de la estructura tridimensional de la proteína AKR1B1 unida a NADP<sup>+</sup> y a la  $\text{PGA}_1$ . Los átomos de carbono de NADP<sup>+</sup> y  $\text{PGA}_1$  están representados en color rosa y azul, respectivamente. La esfera representa la molécula de biotina. La zona señalada por un cuadrado en la izquierda, se muestra ampliada a la derecha. Se señalan los residuos importantes que participan en la interacción de la  $\text{PGA}_1$  con la proteína: Cys298, His110, Tyr48 y Gln50. Los puentes de hidrógeno que establece la  $\text{PGA}_1$  con la proteína están representados por líneas de puntos. La flecha señala el sitio de ataque en la molécula de ciclopentenona del grupo azufre del residuo Cys298.

## 1.2.- Inhibición de la actividad de la AKR1B1 por $\text{PGA}_1$

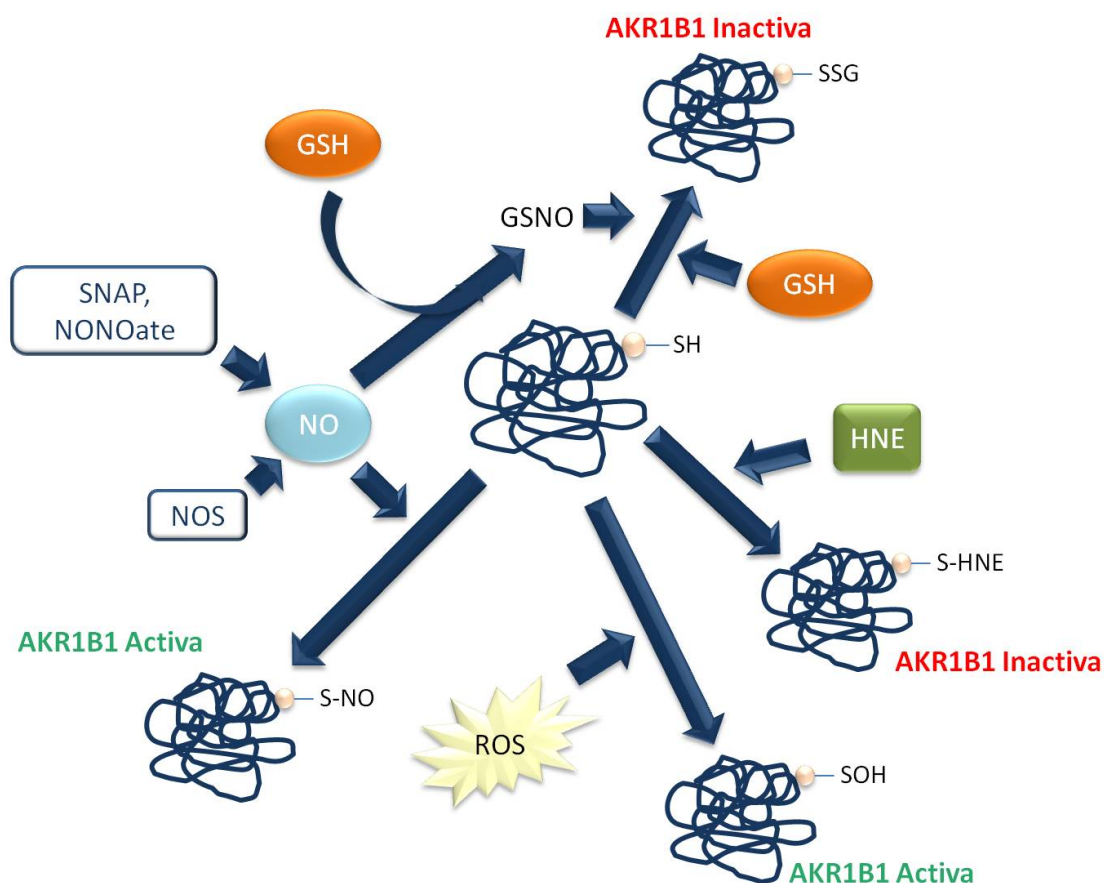
Una vez analizada la unión de la  $\text{PGA}_1$  con la proteína AKR1B1, analizamos las consecuencias funcionales de la interacción. En nuestras condiciones experimentales comprobamos que la interacción de la  $\text{PGA}_1$  con la proteína AKR1B1 provoca la inhibición de su actividad enzimática (Figura 14). Considerando las predicciones del modelo molecular, la inhibición podría producirse por la unión covalente de la  $\text{PGA}_1$  al residuo de Cys298 presente en el centro activo de la proteína. Sin embargo, diversos intentos de localizar el residuo diana de la unión mediante MS no han dado resultado. La cobertura de secuencia obtenida en la digestión de la proteína no fue completa y el péptido que contiene el residuo de cisteína susceptible de ser modificada no se identificó de forma fiable. Tampoco se han identificado otros péptidos con incrementos



de  $m/z$  compatibles con la adición de una molécula de  $\text{PGA}_1$ . Es posible que durante el procesamiento de la muestra, la proteína pueda sufrir oxidaciones o formar puentes disulfuro intra o inter-moleculares que dificulten la identificación de los péptidos obtenidos en la digestión de la proteína. Por otro lado, podría considerarse la posibilidad de que la interacción de la  $\text{PGA}_1$  con la AKR1B1 fuera transitoria e indujera otras modificaciones, por ejemplo oxidaciones, que contribuyeran a la inhibición.

Existen numerosas evidencias que demuestran que el residuo de Cys298 es altamente reactivo y puede regular la actividad de la AKR1B1. Modificaciones postraduccionales en el residuo de Cys298 por diferentes agentes regulan los parámetros cinéticos de la AKR1B1 y disminuyen su susceptibilidad por diferentes inhibidores. La modificación de la enzima con agentes como iodoacetamida (IAA) (Liu et al., 1993) o acroleína (Srivastava et al., 2003), causan un aumento en la actividad catalítica, mientras que la modificación por HNE (Del Corso et al., 1998) o la S-glutathionilación mediada por GSSG, provocan la inactivación de la enzima (Srivastava et al., 2003). Por otro lado, el NO puede regular de forma diferente la actividad de la AKR1B1 dependiendo del donador empleado y de la modificación inducida en la enzima. La nitrosilación de la enzima, es decir, la adición de una molécula de NO a la Cys298, procedente de donadores como NONOate o SNAP, provocan un aumento en la actividad de la enzima. Sin embargo, en un contexto celular, el NO liberado por donadores o precedente de la actividad de la NOS, puede reaccionar con GSH, para formar GSNO, que puede dar lugar a la S-glutathionilación de la enzima, provocando su inactivación (Srivastava et al., 2011). Todas las modificaciones descritas disminuyen la sensibilidad de la enzima de ser inhibida por sorbinil.

Además, se ha descrito que la actividad de la proteína AKR1B1 aumenta con la oxidación del residuo de Cys298 del centro activo a ácido sulfénico, lo que puede ocurrir en situaciones de estrés oxidativo intenso, como por ejemplo durante la isquemia miocárdica. Se ha comprobado que en esta situación, la oxidación de la Cys298 está mediada por peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), derivado a su vez de un aumento en los niveles de NO, sintetizado por la eNOS (Kaiserova et al., 2006; Kaiserova et al., 2008). Las diversas modificaciones postraduccionales del residuo de Cys 298 y su repercusión funcional se resumen en la figura 43.



**Figura 43.- Regulación de la actividad de la proteína AKR1B1.** Modificaciones postraduccionales de la enzima AKR1B1 en el residuo de Cys298 con agentes como HNE o GSH causan la inactivación de la enzima. La nitrosilación o la oxidación del residuo de Cys298 a ácido sulfénico causan un aumento en la actividad catalítica de la enzima.

### 1.3.- Irreversibilidad de la inhibición de la proteína AKR1B1 por $\text{PGA}_1$

Mediante la realización de ensayos de actividad en diferentes condiciones pudimos determinar que la inhibición de la proteína AKR1B1 por  $\text{PGA}_1$  tiene un componente irreversible (Figura 15), lo que podría producirse por la inactivación de la enzima mediante la unión covalente de la  $\text{PGA}_1$  al residuo de Cys298 presente en el centro activo de la proteína.

El estudio de la estabilidad de los aductos de compuestos electrófilos con proteínas es de gran importancia. Se ha descrito que la estabilidad de los aductos con proteínas guarda relación con la intensidad y la duración de la respuesta celular inducida por estos compuestos (Lin et al., 2008).

En general, se acepta que la unión covalente de cyPG a proteínas mediante adición de Michael es un proceso irreversible en condiciones fisiológicas, y únicamente

reversible en condiciones fuertemente alcalinas (Noyori and Suzuki, 1993). Sin embargo, diversas evidencias indican que la estabilidad de estos aductos depende de la estructura de la cyPG y de la proteína, además del microambiente que rodea a la cisteína que resulta modificada. En general, la estabilidad del aducto es inversamente proporcional al pH del entorno (Bickley et al., 2004). Se ha descrito la unión irreversible de la 15d-PGJ<sub>2</sub> a la proteína GSTP1-1 tanto *in vitro* como en células a través del residuo Cys101 (Sánchez-Gómez et al., 2007). Sin embargo, la PGA<sub>2</sub> puede unirse también a la proteína GSTP1-1, en este caso a través del residuo de Cys47 de la proteína y se ha comprobado que dicha unión puede ser revertida en presencia de un exceso de GSH, lo que se ha definido como retro-Michael (van Iersel et al., 1999). La formación de aductos de cyPG con GSH se considera reversible, aunque, como en el caso de las proteínas, su estabilidad depende de la estructura de la cyPG (Noyori and Suzuki, 1993).

Además, se ha descrito la interacción no covalente de cyPG con proteínas. Se ha observado que la 15d-PGJ<sub>2</sub> puede unirse al LBD de PPAR $\gamma$  de forma no covalente, “docked state”, aunque la activación del receptor requiere de la unión covalente del ligando a la Cys285, “locked state” (Shiraki et al., 2006).

En conjunto, nuestros resultados indican que la PGA<sub>1</sub> interacciona con la proteína AKR1B1, probablemente mediante su unión covalente a través del residuo de Cys298 presente en el centro activo de la enzima, y estableciendo otras interacciones con residuos pertenecientes a la tétrada catalítica como His110 y Tyr48, aunque la confirmación de esta posibilidad requiere un estudio más detallado. Esta unión provoca la inhibición, parcialmente irreversible, de la actividad enzimática de la proteína AKR1B1.

## **2.- INTERACCIÓN DE PGA<sub>1</sub>-B CON LA PROTEÍNA AKR1B1**

La utilización de análogos biotinilados ha permitido la identificación de un gran número de dianas celulares de las cyPG (Aldini et al., 2007; Gayarre et al., 2005; Stamatakis et al., 2006). En general, las cyPG biotiniladas reproducen los efectos de las PG originales. Se ha comprobado que son capaces de atravesar la membrana celular, de inhibir la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, de inducir la expresión de la Hsp-70 y HO-1 (Garzón et al., 2010), o de producir la desestructuración del citoesqueleto de vimentina (Stamatakis et al., 2006), tal y como lo hacen las cyPG no biotiniladas. Sin embargo, existen algunas excepciones. Por ejemplo, la 15d-PGJ<sub>2</sub>-B interacciona con

PPAR $\gamma$ , pero con mucha menos afinidad que la 15d-PGJ<sub>2</sub>. Sin embargo, la 15d-PGJ<sub>2</sub>-B no produce la activación de PPAR $\gamma$ , ya que la presencia de biotina impide que el grupo carboxilo establezca interacciones por puentes de hidrógeno con residuos como la Tyr473 presentes en la hélice 12 que se han descrito para la 15d-PGJ<sub>2</sub>, y que contribuyen a la activación del receptor (Waku et al., 2009; Zorrilla et al., 2010).

El modelo molecular de la interacción entre la PGA<sub>1</sub> y la AKR1B1 (Figura 42) establece que, además de las interacciones entre la molécula de PGA<sub>1</sub> y la AKR1B1, en el caso de PGA<sub>1</sub>-B, el enlace amida entre la PGA<sub>1</sub> y el espaciador podría establecer una interacción adicional mediante enlace de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Gln50, mientras que la molécula de biotina quedaría orientada hacia el solvente.

Mediante SDS-PAGE y Western Blot con estreptavidina peroxidasa comprobamos que la PGA<sub>1</sub>-B se une a la proteína recombinante AKR1B1 (Figura 16A). Sin embargo, cuando analizamos la repercusión funcional de la interacción de la PGA<sub>1</sub>-B con la AKR1B1, observamos un comportamiento diferente que al observado con la PGA<sub>1</sub> (Figura 17). Mientras que con la PGA<sub>1</sub>-B se requiere una incubación previa con la proteína para observar la inhibición de la actividad enzimática de AKR1B1, la inhibición por PGA<sub>1</sub> no precisa de dicha incubación. Además, en las mismas condiciones experimentales, la PGA<sub>1</sub> (IC<sub>50</sub> = 16,98  $\mu$ M) ejerce una inhibición más potente que la PGA<sub>1</sub>-B (IC<sub>50</sub> = 50,11  $\mu$ M).

Basándonos en el modelo de dos etapas denominado “dock and lock”, descrito para la activación del receptor PPAR $\gamma$  por 15d-PGJ<sub>2</sub> (Shiraki et al., 2006; Waku et al., 2009), se podría proponer un modelo similar para la inhibición de la proteína AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>. En una primera etapa, “docking”, la PGA<sub>1</sub> se uniría de forma no covalente al centro activo de la proteína AKR1B1, y en una segunda etapa, “locking”, se establecería la unión covalente entre la PG y el residuo Cys298 del centro activo, lo que provocaría la inhibición de la actividad enzimática. En el caso de la PGA<sub>1</sub>-B, podría ocurrir que en solución, el espaciador flexible y la molécula de biotina generen un impedimento estérico que dificulte la interacción no covalente de la PG con la proteína, “docking”, lo que podría explicar que la inhibición sea menos eficaz que la producida por PGA<sub>1</sub>. Sin embargo, esta interpretación de momento es especulativa y precisa soporte experimental.

### 3.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA INTERACCIÓN DE cyPG CON LA AKR1B1

Con objeto de obtener información más detallada sobre los requerimientos estructurales en la unión e inhibición de la proteína AKR1B1, se analizó la interacción de los compuestos 15d-PGJ<sub>2</sub>, CAY10410 y PGE<sub>2</sub> con la proteína.

Con respecto a la 15d-PGJ<sub>2</sub>, comprobamos que inhibe la actividad enzimática de la proteína recombinante AKR1B1 (Figura 18A). Además, la 15d-PGJ<sub>2</sub> resultó ser un inhibidor más potente que la PGA<sub>1</sub>, como indican las IC<sub>50</sub> obtenidas de 9,48 μM con la 15d-PGJ<sub>2</sub> y 20,64 μM con la PGA<sub>1</sub>. Por otro lado, los resultados obtenidos mediante los ensayos de competición en gel (Figura 19) sugieren que la 15d-PGJ<sub>2</sub> interacciona con la proteína recombinante AKR1B1, ya que reduce la unión de la PGA<sub>1</sub>-B. Además, dicha interacción tiene un componente irreversible, que podría estar producido por la unión covalente de la 15d-PGJ<sub>2</sub> a la proteína dada su alta reactividad.

El compuesto CAY10410 es un análogo de 15d-PGJ<sub>2</sub>, que carece del carbono electrófilo en el anillo de ciclopentano. Debido a la ausencia de estructura ciclopentenona, este compuesto no reproduce muchos de los efectos biológicos de la 15d-PGJ<sub>2</sub>. Por un lado, no induce estrés oxidativo ni citotoxicidad en las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, ni se une a la proteína tioxirredoxina recombinante humana (Shibata et al., 2003). Tampoco induce la expresión de la enzima COX-2 en las células MCF-7, mediante la activación de la vía de Akt (Kim et al., 2008a). Además, tampoco es capaz de reproducir el efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub> en la inhibición de la inducción de iNOS, COX-2 o ICAM-1 en células mesangiales estimuladas con citoquinas (Sánchez-Gómez et al., 2004).

Nuestros resultados demostraron que el CAY10410 tiene los mismos efectos que la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la proteína recombinante AKR1B1. El compuesto CAY10410 inhibió la actividad enzimática de AKR1B1 con una potencia similar a la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Figura 18B), con una constante IC<sub>50</sub> de 10,7 μM. Además, en los experimentos de competición, comprobamos que el CAY10410 interacciona con la proteína AKR1B1, y que esta unión parece tener también un componente irreversible (Figura 19).

Es preciso señalar que el CAY10410 posee un carbono electrófilo en la posición C13, que le permite unirse covalentemente a algunas proteínas, como a la proteína c-Jun, aunque con menor afinidad que la 15d-PGJ<sub>2</sub>. También se une covalentemente al receptor PPARγ, activándolo con una potencia similar a la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Sánchez-Gómez

et al., 2004; Shiraki et al., 2005). Por lo tanto, nuestros resultados podrían proporcionar un nuevo ejemplo de interacción de cyPG con proteínas a través del C13. Sin embargo la confirmación de esta posibilidad requiere un estudio más detallado.

La PGE<sub>2</sub> es la PG precursora de la PGA<sub>2</sub>. En los años 70, numerosas evidencias mostraron que las PG de la serie E inhibían el crecimiento e inducían diferenciación en varias líneas celulares (Honn et al., 1981). Sin embargo, Ohno y cols. describieron en 1986 que la PGA<sub>2</sub>, el producto de deshidratación de la PGE<sub>2</sub>, era la responsable de los efectos antitumorales, gracias a la presencia del carbono  $\alpha/\beta$  insaturado en su estructura (Ohno et al., 1986). La PGE<sub>2</sub> es un prostanoide proinflamatorio que controla procesos tales como la fiebre o el dolor. En diferentes modelos experimentales, se ha descrito que esta PG puede mediar procesos de proliferación e invasión tumoral. No obstante, esta PG puede desencadenar efectos opuestos dependiendo del contexto biológico. Por ejemplo, la PGE<sub>2</sub> a través de su interacción con el receptor EP4, media acciones antiinflamatorias en intestino. Además, se ha demostrado que a través del receptor EP3, la PGE<sub>2</sub> puede inhibir la respuesta alérgica inflamatoria desencadenada por PGD<sub>2</sub> y citoquinas (Narumiya, 2009). Por otro lado, además del papel bien conocido de la PGE<sub>2</sub> en tumorigénesis, se ha visto que en algunos modelos puede tener efectos anti-proliferativos (Ishihara et al., 2004).

En nuestras condiciones experimentales, la PGE<sub>2</sub> inhibe la actividad enzimática de la proteína recombinante AKR1B1, con una constante IC<sub>50</sub> de 79,43  $\mu$ M (Figura 18C), con lo que esta PG resultó ser mucho menos potente que la PGA<sub>1</sub>. Los ensayos de competición en gel también sugieren que la PGE<sub>2</sub> interacciona con la proteína AKR1B1 (Figura 19). Sin embargo, esta interacción resultó ser totalmente reversible, probablemente debido a la ausencia de carbono electrófilo en su estructura, con lo que no se forma un aducto covalente.

En conjunto, estos resultados apoyan la importancia de la presencia de al menos un carbono electrófilo en la estructura de la PG, para la modificación covalente de la proteína recombinante AKR1B1 y para la inhibición de su actividad.

### 3.1.- Inhibición de AKR1B1 por otros compuestos

Los compuestos AD-5467 y zopolrestat, son inhibidores de la aldosa reductasa, desarrollados hace años, para el tratamiento de las complicaciones diabéticas secundarias.

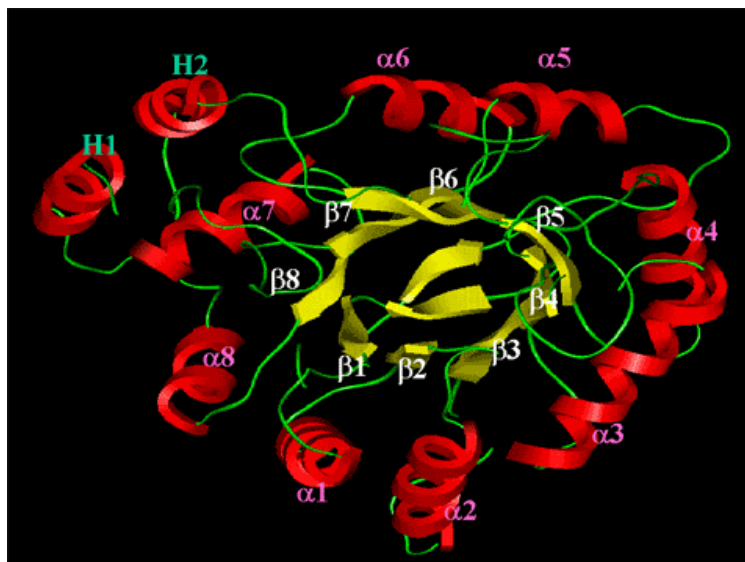
El AD-5467 fue seleccionado en los años 90 entre una batería de compuestos estructuralmente relacionados como el más eficaz en inhibir la acumulación de sorbitol en nervio ciático en un modelo animal (Tawada et al., 1990). Se ha descrito que este compuesto inhibe la actividad aldosa reductasa con una  $IC_{50}$  de 51 nM.

El compuesto zopolrestat, sintetizado también en los años 90, es otro inhibidor muy eficaz de la aldosa reductasa, con una  $IC_{50}$  *in vitro* de 3,1 nM. Este compuesto inhibe la acumulación de sorbitol en nervio ciático, retina y cristalino, y ha mostrado un efecto protector en el desarrollo de complicaciones diabéticas secundarias en modelos animales (Beyer-Mears et al., 1996). Además, resultó tener una buena farmacocinética, alcanzando niveles elevados en sangre de pacientes tras su administración, por lo que en un principio se calificó como favorable para el tratamiento de las complicaciones diabéticas secundarias (Inskeep et al., 1994; Mylari et al., 1991).

Considerando la importancia de estos compuestos, analizamos su efecto sobre la actividad de la proteína recombinante AKR1B1 en nuestras condiciones experimentales, y comprobamos que el AD-5467 (Figura 20) y el zopolrestat inhibieron la actividad AKR1B1 con una  $IC_{50}$  de 0,45  $\mu$ M y 0,034  $\mu$ M, respectivamente, lo que muestra que estos compuestos resultaron inhibidores más eficaces que la  $PGA_1$  *in vitro*. Sin embargo, dado que estos inhibidores presentan importantes efectos secundarios, resultaría interesante explorar el potencial inhibidor de la  $PGA_1$  *in vivo*.

### 4.- EFECTO DE NADP/NADPH SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA AKR1B1 POR $PGA_1$

La proteína AKR1B1 tiene una estructura tridimensional en forma de barril ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub>, estructura que se caracteriza por la presencia de 8 hélices  $\alpha$  que se alternan con 8 láminas  $\beta$  (Figura 44). El sitio de unión del sustrato se encuentra ubicado en el extremo C-terminal de la proteína, una zona altamente hidrofóbica, junto al sitio de unión al cofactor NADP<sup>+</sup>/NADPH, zona que conforma el centro activo de la enzima.



**Figura 44.- Estructura de barril  $(\alpha\beta)_8$  característica de las AKR.**  
En amarillo se muestran las láminas  $\beta$  y en rojo las hélices  $\alpha$ . (Figura tomada de <http://www.med.upenn.edu/akr/>)

Se ha propuesto que la AKR1B1 lleva a cabo un mecanismo de reacción secuencial ordenado, donde el NADPH se une a la enzima antes que el sustrato, y el NADP<sup>+</sup> se libera después del producto, siendo el paso limitante de la reacción la liberación del NADP<sup>+</sup>. Mediante estudios de la estructura cristalina de la proteína AKR1B1 unida a NADPH, se ha descrito que tanto la unión del NADPH como la liberación del NADP<sup>+</sup> de la enzima provocan un cambio conformacional en la estructura de la proteína. Cuando el NADPH se encuentra unido a la proteína, el grupo C4 donador de hidrógeno del anillo de nicotinamida del nucleótido queda orientado hacia la cavidad hidrofóbica que conforma el centro activo. Entre los residuos polares cercanos al C4, se encuentran la His110, la Tyr48, que actúa como donador de protones en la reacción catalítica, y la Cys298 (Borhani et al., 1992; Petrash, 2004). Se ha descrito que la Cys298 está localizada a una distancia de 4,1Å del grupo C4 del anillo de nicotinamida del NADPH, por lo que al formarse el complejo E:NADPH, la Cys298 queda colocada en una posición menos accesible al solvente. Debido a esto, la incubación con NADPH o NADP<sup>+</sup> protege a la enzima de la modificación en el residuo Cys298 por diferentes agentes como GSH, NO, HNE y IAA (Chandra et al., 1997a; Chandra et al., 1997b; Del Corso et al., 1998; Liu et al., 1993). En otros miembros de la familia AKR se han realizado observaciones similares, por ejemplo, la enzima AKR1B10 cuando se preincubó con NADPH fue menos sensible a la modificación e inactivación por 4-oxo-2-nonenal (4-ONE) (Martin and Maser, 2009).



Sin embargo, la coincubación de la enzima AKR1B1 con NADPH y el sustrato D,L-gliceraldehído, no produjo la protección de la enzima frente a la inactivación por donadores de NO. Esta observación indica que la enzima preferentemente es sensible a la inactivación durante la catálisis (Chandra et al., 1997a).

Nuestros resultados demuestran que la preincubación de la AKR1B1 con NADPH reduce de forma significativa la modificación por PGA<sub>1</sub>-B (Figura 21). Además, la preincubación tanto con NADPH (Figura 22) como con NADP<sup>+</sup> (Figura 23B) evitó en gran medida la inhibición de la actividad enzimática de la AKR1B1 por PGA<sub>1</sub>. En relación con las observaciones anteriores, nuestros resultados sugieren que en presencia del nucleótido, la Cys298, que es la diana más probable de la modificación por PGA<sub>1</sub>, está menos accesible.

Esta hipótesis también podría contribuir a interpretar la diferente intensidad de inhibición de la AKR1B1 por PGA<sub>1</sub> en las distintas condiciones experimentales utilizadas, en las que se obtuvieron 3 valores distintos de IC<sub>50</sub> para la PGA<sub>1</sub> (Tabla 3). Los valores más bajos de IC<sub>50</sub>, 6,16 y 16,98  $\mu$ M, se obtuvieron cuando la PGA<sub>1</sub> se preincubó con la proteína antes de la medida de la actividad, mientras que el valor más alto de IC<sub>50</sub>, 20,64  $\mu$ M, se obtuvo cuando se midió la actividad AKR1B1 en presencia de PGA<sub>1</sub> en la cubeta de ensayo, pero sin preincubación. En este último caso, la presencia del NADPH o NADP<sup>+</sup> en el ensayo enzimático podría contribuir a reducir la potencia de inhibición. En esa situación, el residuo de Cys298 presente en el centro activo de la enzima estaría menos accesible a la unión de compuestos electrófilos, tales como PGA<sub>1</sub>, con lo que la unión de la PG a la proteína sería menor.

## **5.- CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LA PGA<sub>1</sub> CON LA PROTEÍNA AKR1B10**

La proteína AKR1B10 tiene una gran importancia en la fisiopatología humana. Desde que Fukumoto en 2005 la describiera como un marcador tumoral de NSCLC (Fukumoto et al., 2005), muchos han sido los estudios que se han realizado con objeto de determinar cuál es el papel de esta proteína en el desarrollo de tumores. Actualmente se sabe que puede interferir en la ruta de síntesis de los ácidos retinoicos o en la ruta de síntesis de los ácidos grasos, procesos que están directamente implicados en el desarrollo de patologías tumorales (Gallego et al., 2006; Ma et al., 2008). Además, la AKR1B10 está implicada en el desarrollo de quimiorresistencia a fármacos antitumorales con grupos carbonilo en su estructura (Balendiran, 2009). Por estos

motivos, la AKR1B10 es una importante diana terapéutica contra la que se han desarrollado múltiples inhibidores de diferente naturaleza. Debido a la importancia fisiopatológica de esta proteína, la identificación de proteínas AKR como dianas de  $\text{PGA}_1$ , justificó el interés del estudio detallado de la interacción de esta PG con la AKR1B10.

### 5.1.- Modificación de la proteína AKR1B10 por $\text{PGA}_1$

Los resultados obtenidos utilizando la proteína recombinante AKR1B10 y análisis por MS, demuestran que la  $\text{PGA}_1$  modifica covalentemente la AKR1B10 *in vitro*. Además, se determinó que la unión se produce a través de los residuos de Cys299 o Cys187 (Figura 24, 25 y 26).

Mediante experimentos en un contexto celular, se confirmaron estas observaciones. Demostramos que la proteína AKR1B10 expresada de forma exógena en células COS-7 es modificada covalentemente por  $\text{PGA}_1$ -B (Figura 27A). Además, mediante la mutagénesis del residuo Cys299 del centro activo de la proteína, se comprobó que este residuo es esencial en la unión de la PG a la proteína, ya que la incorporación de biotina al mutante Cys299Ser fue prácticamente indetectable (Figura 27A).

El modelado molecular realizado con la proteína AKR1B1 predijo que la  $\text{PGA}_1$  se introduciría en el centro activo de la enzima, y establecería interacciones favorables con los residuos Cys298, His110 y Tyr48, estableciendo posiblemente un enlace covalente con la Cys298 (Figura 42). Dada la elevada identidad de secuencia entre las proteínas AKR1B1 y AKR1B10, es de esperar que la interacción de la  $\text{PGA}_1$  con el centro activo de ambas enzimas sea muy similar.

Estas evidencias, en conjunto, apuntan a que la interacción más favorable de la  $\text{PGA}_1$  con la proteína AKR1B10 tiene lugar mediante su introducción en el centro activo de la enzima y su unión covalente, por adicción de Michael, dada su naturaleza electrófila, al residuo de Cys299. Este parece ser el sitio de interacción más relevante en células, aunque no se puede descartar la implicación de otros residuos de cisteína, por ejemplo, el residuo Cys187 en la interacción *in vitro*.

Una vez estudiada la unión de la  $\text{PGA}_1$  a la proteína, nos interesó analizar la repercusión funcional de dicha interacción. Comprobamos que tanto la  $\text{PGA}_1$  como su análogo biotinilado, inhibieron la actividad enzimática de la proteína AKR1B10

expresada en células COS-7, con una potencia similar. Además, la mutación del residuo de Cys299, redujo considerablemente esta inhibición (Figura 28 y 29).

Se ha descrito ampliamente que el residuo de Cys299 de la proteína AKR1B10 tiene una gran importancia. Por una parte, contribuye a la estabilización de algunos inhibidores en su interacción con el centro activo de la enzima. Se ha comprobado que la mutación de la Cys299 por serina disminuyó la susceptibilidad de la enzima de sufrir el ataque de grupos electrófilos como 4-ONE (Martin and Maser, 2009), y de ser inhibida por compuestos como sorbinil o ciprofibrato, mientras que favoreció la inhibición del fenofibrato y gemfibrozil. Sin embargo, dicha mutación no afectó la inhibición de la enzima por el zopolrestat. Además, el residuo de Cys299 participa en la interacción del sustrato con la proteína. La mutación de la Cys299 por serina disminuyó la afinidad de la enzima por el sustrato gliceraldehído, así como la eficacia catalítica (Balendiran, 2009; Verma et al., 2008). Esta observación coincide con los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales, ya que la actividad de la AKR1B10 se redujo a la mitad cuando se mutó el residuo de Cys299 por serina (Figura 29).

Los residuos His111 y Tyr49, equivalentes a los residuos His110 y Tyr48 en la proteína AKR1B1, pertenecen a la tétrada catalítica, y participan en la catálisis. Numerosos estudios han demostrado la interacción de inhibidores con estos residuos en su unión a la proteína AKR1B10. Entre ellos, la bidismetoxicurcumina, el tolrestat (Gallego et al., 2007; Matsunaga et al., 2009) o el compuesto ácido isolitocólico, establecen interacciones con los residuos, Tyr49 y H111 mediante puentes de hidrógeno, en su unión a la AKR1B10 (Endo et al., 2009).

En nuestro modelo experimental observamos que la mutación de los residuos His111 y Tyr49 redujo la unión de la  $\text{PGA}_1\text{-B}$  a la proteína AKR1B10 expresada en células COS-7 (Figura 27B). Estos resultados sugieren que estos residuos participan en la estabilización de la PG en el centro activo de la enzima, observaciones que concuerdan con las predicciones obtenidas del modelo molecular (Figura 42).

Por otro lado, la actividad de los mutantes His111Ala y Tyr49Phe de la proteína AKR1B10 fue indetectable en nuestras condiciones experimentales, confirmando la importancia de estos dos residuos en la catálisis enzimática. Estos resultados concuerdan con los publicados en la bibliografía para la proteína AKR1B1 (Tarle et al., 1993).

El conjunto de nuestras observaciones indica que la  $\text{PGA}_1$  se une covalentemente a la proteína AKR1B10 a través del residuo de Cys299 del centro activo y que dicha

unión es estabilizada por la interacción con los residuos His111 y Tyr49 también presentes en el centro activo. La unión de la PG a la proteína provoca la inhibición de la enzima.

## 5.2.- Factores estructurales implicados en la interacción de PGA<sub>1</sub> con AKR1B10

Para profundizar en el conocimiento de los factores estructurales que intervienen en la inhibición de la enzima, analizamos el efecto de otros compuestos sobre la actividad de la AKR1B10 expresada en células COS-7.

Las cyPG de la serie A, PGA<sub>1</sub> y PGA<sub>2</sub>, ejercen efectos antitumorales en diversos sistemas biológicos, y llevan a cabo sus acciones mediante la interacción con diferentes moléculas señalizadoras (Díez-Dacal and Pérez-Sala, 2012). Comprobamos que la PGA<sub>2</sub> inhibe la actividad de la proteína AKR1B10 expresada en células COS-7, en un grado similar a la PGA<sub>1</sub> (Figura 30B), lo que indica que la estructura de las PGAs es propicia para la inhibición de la proteína AKR1B10.

Los isoprostanos con estructura ciclopentenona son compuestos sintetizados por la vía de los isoprostanos, es decir a partir del AA de forma independiente de la COX, y que poseen en su estructura un carbono  $\alpha/\beta$  insaturado en el anillo de ciclopentano. Se han encontrado niveles en el rango nanomolar de estos compuestos en diferentes tejidos (Chen et al., 1999). Estos compuestos son isómeros estructurales de las cyPG, y por lo tanto, comparten su reactividad y muchos de sus efectos biológicos. Se ha descrito que los isoprostanos con estructura ciclopentenona reducen la inducción de mediadores inflamatorios como IL-6 y TNF- $\alpha$ , inducen apoptosis en distintos tipos celulares, producen la modificación directa de Keap1 y la activación de Nrf2, suprimen la respuesta inflamatoria inducida por LPS por la vía de NF- $\kappa$ B, inhiben la inducción de la COX-2 y de la iNOS, y son capaces de activar PPAR $\gamma$ . Por lo tanto, estos compuestos pueden ejercer efectos antiinflamatorios al igual que las cyPG (Levonen et al., 2004; Milne et al., 2005; Milne et al., 2011).

Los compuestos 8-iso-PGA<sub>1</sub> y 8-iso-PGA<sub>2</sub>, son los isómeros estructurales de PGA<sub>1</sub> y PGA<sub>2</sub>, respectivamente. Pudimos comprobar que 8-iso-PGA<sub>1</sub> y 8-iso-PGA<sub>2</sub>, inhiben la actividad enzimática de la proteína AKR1B10, aunque en menor grado que las correspondientes PG (Figura 30B). Dado que los isoprostanos tienen las cadenas laterales en sentido *cis*, esta estructura podría resultar desfavorable en la interacción con el centro activo de la proteína AKR1B10. En resultados anteriores de nuestro grupo de

investigación se demostró que tanto la  $\text{PGA}_1$  como la 8-iso- $\text{PGA}_1$  se unen covalentemente a la proteína recombinante H-Ras a través del residuo de Cys118 presente en el sitio de unión a GTP (Renedo et al., 2007). Sin embargo, en un contexto celular, diferentes factores pueden contribuir a la menor efectividad de los isoprostanos como inhibidores de la AKR1B10, incluyendo factores derivados de su permeabilidad a través de las membranas, de su metabolismo, que ocurre por conjugación con GSH catalizada por enzimas GST (Milne et al., 2011), o de su transporte al exterior de la célula.

El compuesto ciclopentenona carece de cadenas laterales en su estructura. Comprobamos que la inhibición de la actividad enzimática de la AKR1B10 por ciclopentenona resultó indetectable en nuestras condiciones experimentales (Figura 30B). En resultados anteriores de nuestro grupo de investigación, se demostró que la ciclopentenona fue capaz de reproducir los efectos antiinflamatorios ejercidos por la 15d-PGJ<sub>2</sub>, como la inhibición de la inducción de la iNOS, COX-2 e ICAM-1 en células mesangiales estimuladas con citoquinas (Sánchez-Gómez et al., 2004). Sin embargo, la concentración utilizada de ciclopentenona para la observación de estos efectos fue de 100  $\mu\text{M}$ , muy superior a la utilizada de 15d-PGJ<sub>2</sub> (5  $\mu\text{M}$ ), y a la utilizada de  $\text{PGA}_1$  (60  $\mu\text{M}$ ) en la inhibición de AKR1B10 en las células COS-7.

Estos resultados indican que la estructura ciclopentenona es favorable para la inhibición de la proteína AKR1B1 en un entorno celular. Sin embargo, la presencia de las cadenas laterales es esencial para ejercer dicho efecto, bien porque faciliten la entrada en la célula o porque establezcan interacciones con la proteína que ayudan a estabilizar la unión.

El fenofibrato pertenece al grupo de los fibratos, compuestos derivados del ácido fibríco. Estos compuestos son agonistas de  $\text{PPAR}\alpha$ , y han sido ampliamente utilizados desde hace décadas en el tratamiento de las hiperlipidemias. Estos compuestos son inhibidores tanto de AKR1B1 como de AKR1B10, aunque la mayoría de ellos son más potentes frente a AKR1B1. Se ha descrito que el fenofibrato inhibe la actividad de la enzima AKR1B10 *in vitro* con una  $\text{IC}_{50}$  de 25  $\mu\text{M}$  (Balendiran, 2009). En nuestras condiciones experimentales no se detectó inhibición de la AKR1B10 expresada en células COS-7 por este compuesto (Figura 30B). El fenofibrato puede metabolizarse en el organismo a ácido fenofibríco, su metabolito activo, el cual es mucho menos eficaz en la inhibición de la proteína AKR1B10 *in vitro* (Balendiran, 2009). Es posible, que en el contexto de las células COS-7, el fenofibrato pueda hidrolizarse a ácido fenofibríco,

lo que podría explicar la ausencia de inhibición por este compuesto en nuestras condiciones experimentales.

Asimismo, pudimos comprobar que el compuesto AD-5467, inhibidor de la AKR1B1 (Ohtori et al., 1991), inhibió eficazmente la actividad enzimática de AKR1B10 expresada en células COS-7 (Figura 30B). Este resultado indica que, al igual que otros inhibidores descritos para la AKR1B1 inhiben eficazmente la AKR1B10 (Gallego et al., 2007), el AD-5467 podría suponer un inhibidor efectivo de la AKR1B10 y sería interesante estudiar su potencial terapéutico en patologías en las que esta enzima está implicada.

## **6.- SELECTIVIDAD DE LA MODIFICACIÓN DE LA AKR1B10 POR $\text{PGA}_1$ EN CÉLULAS COS-7**

La modificación de proteínas celulares por cyPG no es un proceso aleatorio, sino que presenta una selectividad que depende de diferentes factores. Concretamente, puede depender de la estructura de la PG y de la proteína diana. Resultados de nuestro grupo de investigación mostraron que análogos biotinilados de cyPG con estructura de enona sencilla, como  $\text{PGA}_1$ , y con estructura dienona, como 15d-PGJ<sub>2</sub>, generan patrones de modificación de dianas celulares diferentes en fibroblastos de ratón (Gayarre et al., 2005). Cabe destacar que la 15d-PGJ<sub>2</sub> presenta una reactividad mucho mayor que la  $\text{PGA}_1$ , tal y como se ha demostrado en diferentes situaciones, donde se han requerido concentraciones de entre 5 y 10 veces mayores de  $\text{PGA}_1$  para reproducir los efectos ejercidos por 15d-PGJ<sub>2</sub> (Rossi et al., 2000; Straus et al., 2000).

Además, el entorno celular es altamente importante en la modificación de proteínas por cyPG. Así, factores como la diferente permeabilidad de estos compuestos en la célula, la distribución subcelular o la interacción de estas cyPG con GSH, influyen en la modificación selectiva de dianas por estos compuestos. Se ha descrito que los aductos de cyPG con estructura de enona sencilla con GSH son más estables que los aductos con cyPG dienonas (Bickley et al., 2004; Suzuki et al., 1997).

En relación con la AKR1B10, analizamos la selectividad de modificación de esta proteína expresada en células COS-7. Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, se utilizaron concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub>-B y de  $\text{PGA}_1$ -B que resultaban en una incorporación de biotina similar en los extractos proteicos totales. En estas condiciones observamos que la  $\text{PGA}_1$ -B modifica a la proteína AKR1B10, resultado que fue ya evidente a la concentración más baja de  $\text{PGA}_1$ -B utilizada. Sin embargo, la

modificación de AKR1B10 por 15d-PGJ<sub>2</sub>-B se observó únicamente a concentraciones altas de esta PG, a las que se produce una modificación exhaustiva de las proteínas celulares (Figura 31A). Por lo tanto, la PGA<sub>1</sub>-B muestra una mayor selectividad para la modificación de la proteína humana AKR1B10 expresada en células COS-7.

Además, utilizando el mismo criterio que el expuesto anteriormente, analizamos la inhibición de la AKR1B10 por ambos prostanoides, y comprobamos que la inhibición de la actividad enzimática de esta proteína también es selectiva de PGA<sub>1</sub>, ya que no se detectó inhibición considerable de la actividad AKR1B10 por la 15d-PGJ<sub>2</sub> en comparación con la ejercida por la PGA<sub>1</sub> (Figura 31B). En este contexto, los resultados del modelo molecular no predicen interacciones favorables para la unión de 15d-PGJ<sub>2</sub> al centro activo de la AKR1B1 (resultados no mostrados), aunque no excluyen que la 15d-PGJ<sub>2</sub> pueda unirse a cisteínas reactivas y expuestas de las AKR adoptando otra conformación.

## **7.- SELECTIVIDAD DE MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS AKR POR PGA<sub>1</sub>**

Las proteínas AKR1B1 y AKR1B10 comparten más de un 70 % de identidad de secuencia. La elevada homología entre estas dos proteínas implica que existan compuestos capaces de inhibir ambas enzimas. Así, inhibidores de la AKR1B1, como tolrestat, sorbinil, zopolrestat, fenofibrato, etc, inhiben también la actividad de la AKR1B10. Sin embargo, a diferencia del tolrestat, que inhibe con la misma eficacia la actividad de ambas enzimas, el resto de los inhibidores son menos eficaces para inhibir la AKR1B10 (Endo et al., 2010a).

Por el contrario, recientemente se han desarrollado inhibidores selectivos de la AKR1B10 frente a la AKR1B1. Esta selectividad se ha atribuido a la interacción de estos compuestos con un bolsillo selectivo en el centro activo de la AKR1B10 formado por residuos que no están conservados en la AKR1B1. Estos residuos incluyen Gln114, Val301, Gln303, Ser 304 y Lys125 (Soda et al., 2012). Compuestos procedentes del propóleo derivados del ácido cinámico (Soda et al., 2012), o el ácido oleanólico (Takemura et al., 2011) son inhibidores selectivos de la AKR1B10 que establecen interacciones con los residuos que conforman el bolsillo específico.

Por lo tanto, pequeños cambios en los aminoácidos que participan en la unión del inhibidor a la enzima determinan el tamaño, la forma, la hidrofobicidad o el potencial electrónico de dicho bolsillo, y determinan así, la selectividad de los inhibidores frente a estas dos enzimas.

En nuestras condiciones experimentales comprobamos que la PGA<sub>1</sub>-B no se une a la proteína AKR1B1 expresada en las células COS-7. Por el contrario, si se une a la proteína AKR1B8, proteína homóloga a la AKR1B10 en ratón (Figura 32). Estos resultados sugieren que la unión de la PGA<sub>1</sub>-B a la proteína AKR1B1 podría requerir, además de las interacciones ya conocidas, de interacciones adicionales con residuos específicos, que no están presentes o accesibles en la proteína AKR1B1, lo que indica que la PGA<sub>1</sub>-B podría unirse selectivamente a la proteína AKR1B10 en estas células. Por otro lado, considerando la reactividad del residuo de Cys298 presente en el centro activo de la AKR1B1, ésta podría sufrir oxidaciones o modificaciones postraduccionales en este entorno celular que impidan la interacción de la PGA<sub>1</sub>-B con la proteína. Sin embargo, estas hipótesis requieren estudios adicionales.

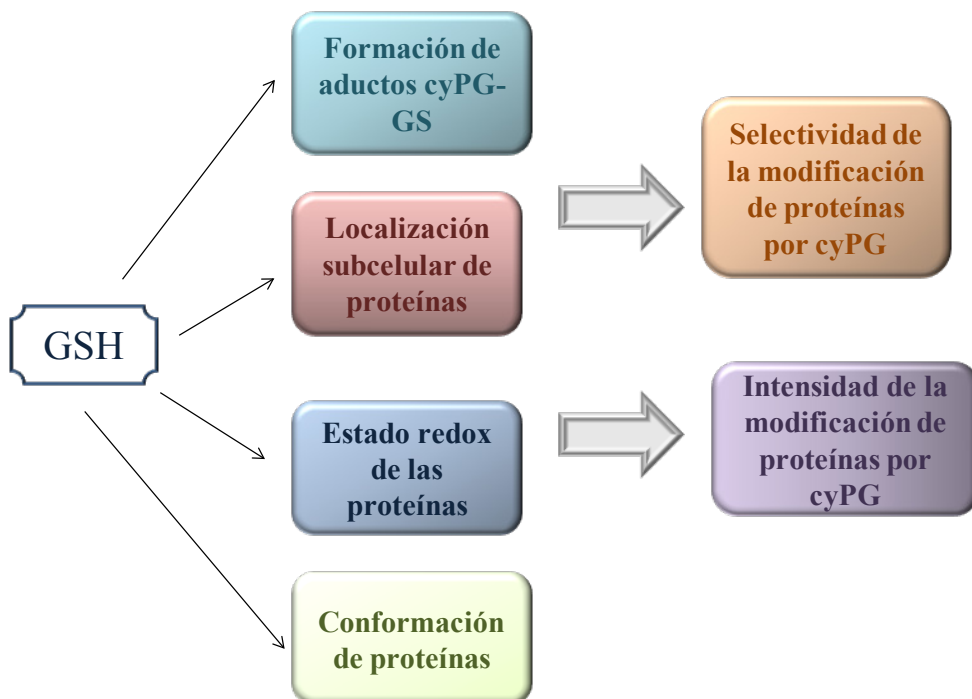
## **8.- CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN E INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA AKR1B10 POR PGA<sub>1</sub> EN UN MODELO CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN**

Una vez comprobado que la PGA<sub>1</sub> se une e inhibe la actividad enzimática de la proteína AKR1B10 expresada en células COS-7, se procedió a estudiar estos fenómenos en un modelo de adenocarcinoma de pulmón humano, las células A549. Esta línea celular es un excelente modelo para estudios sobre el metabolismo pulmonar humano, y es ampliamente utilizada en la evaluación *in vitro* de la eficacia de diferentes compuestos con potencial actividad antineoplásica para el tratamiento de patologías tales como NSCLC (Litwiniec et al., 2010). Las células A549 expresan altos niveles de proteínas AKR, siendo la AKR1B10 la forma mayoritaria, aunque también expresan otras como la AKR1B1 y las AKR1C1,2,3 y 4 (Ebert et al., 2011). Dadas las evidencias que relacionan a la AKR1B10 con el desarrollo de cáncer de pulmón (Fukumoto et al., 2005; Yan et al., 2007), el estudio de esta enzima en este sistema celular tiene una gran relevancia ya que podría contribuir a dilucidar los mecanismos que la implican directamente en carcinogénesis, además de facilitar la búsqueda de posibles inhibidores para el tratamiento de este tipo de tumores.

Nuestros resultados obtenidos mediante cromatografía en neutravidina-agarosa indican que la PGA<sub>1</sub>-B se une covalentemente a la proteína AKR1B10 en las células A549 (Figura 13B). Además, comprobamos que tanto la PGA<sub>1</sub> como su análogo biotinilado inhiben la actividad enzimática AKR en las células A549 (Figura 33B). Este



resultado pone de manifiesto una vez más cómo el análogo biotinilado de la  $\text{PGA}_1$  reproduce los efectos biológicos de la PG no biotinilada.



**Figura 45.- Implicación del GSH en la modificación de proteínas por cyPG.** La presencia del GSH en la célula puede afectar al estado redox, la conformación o la localización subcelular de las proteínas, lo que influye directamente en la selectividad y en la intensidad de la modificación de proteínas por cyPG, factores que también dependen tanto de la proteína como de la cyPG. Además, el GSH puede formar aductos con las cyPG de forma tanto enzimática como no enzimática, lo que influye también en los efectos biológicos de estos compuestos.

### 8.1.- Efecto del GSH en la interacción de $\text{PGA}_1$ con proteínas AKR en las células A549

Los niveles de GSH intracelulares influyen en gran medida en los efectos de las cyPG en la célula mediante diversos mecanismos que incluyen su participación en la destoxificación de estos compuestos. En la figura 45 se muestra un esquema de la implicación del GSH en la modificación de proteínas celulares por cyPG.

El GSH se sintetiza de novo a través de la acción secuencial de dos enzimas dependientes de ATP, la  $\gamma$ -GCS y la glutatión sintetasa, donde la  $\gamma$ -GCS es la enzima limitante (Zhang and Forman, 2012).

La familia de las GST constituye uno de los principales sistemas de detoxificación que existen en la célula. Estas enzimas catalizan la conjugación de compuestos tanto endógenos como exógenos con GSH, para su posterior exportación de la célula mediante proteínas transportadoras como MDR1 o MRP1 (Tew, 2007).

Una característica muy común en tumores, es que se encuentran muy desarrollados los sistemas de detoxificación de compuestos xenobióticos. Por ejemplo, se han encontrado elevados niveles de alguna de las isoformas de las enzimas de la familia de las GST, como GSTP1, en NSCLC, entre otros tumores (Tew, 2007). Además, se ha comprobado que el tratamiento de las células con BSO, un inhibidor específico de la  $\gamma$ -GCS, disminuye los niveles de GSH intracelulares y aumenta la sensibilidad de las células a determinados fármacos antitumorales (Goto et al., 2001; Meijer et al., 1990).

Se ha descrito que dado su carácter electrófilo, las cyPG, y concretamente las PGAs, pueden reaccionar con el GSH intracelular de forma tanto no enzimática como catalizada por enzimas GST, lo que disminuye sus efectos biológicos (Bogaards et al., 1997).

Además, se ha demostrado que los conjugados PGA-GS pueden ser exportados de la célula mediante proteínas transportadoras de tipo MRP1 (Evers et al., 1997). En resultados previos de nuestro grupo de investigación se comprobó que la inhibición de la síntesis de GSH por BSO produjo un aumento de la modificación de proteínas por PGA<sub>1</sub>-B en fibroblastos de ratón (Gayarre et al., 2005).

Sin embargo, el efecto del GSH en la modificación de proteínas por PGAs es dependiente de la proteína. En el caso de la proteína recombinante GSTP1, la presencia de GSH reduce la modificación por esta cyPG. Esto podría producirse por la formación de un aducto cyPG-GSH, o por la unión del GSH a la proteína, lo que induciría un cambio conformacional que provoca que las cisteínas reactivas queden inaccesibles a la modificación por otros compuestos. Sin embargo, en algunos casos, la presencia de GSH puede ayudar a mantener el estado reducido de los grupos tioles presentes en proteínas sensibles a la oxidación, lo que favorece la formación de aductos con grupos electrófilos. Por ejemplo, la unión de PGA<sub>1</sub>-B a la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B aumenta en presencia de GSH, *in vitro* (Gayarre et al., 2007). Además, se ha descrito que la unión

del GSH al carbono electrófilo de una cyPG de estructura enona sencilla, podría proteger dicho carbono del ataque de otros grupos nucleófilos, y ayudaría al transporte de esta cyPG al compartimento subcelular en el que ejercerá su acción. Una vez allí, el GSH se liberaría de la cyPG favoreciendo la formación de un aducto más estable con una cisteína en un entorno más favorable presente en la proteína diana. Además, algunos estudios han señalado que los aductos de cyPG con grupos tioles pueden ejercer diferentes efectos biológicos en las células (Bickley et al., 2004).

En los experimentos con las células A549 comprobamos que, tanto la modificación de proteínas AKR por PGA<sub>1</sub>-B, como la inhibición de la actividad AKR tanto por PGA<sub>1</sub> como por su análogo biotinilado, aumentaron con la inhibición de la síntesis de GSH con BSO. Además, el tratamiento de las células A549 con BSO por sí sola también redujo la actividad AKR (Figura 34B y C), lo que indica que la actividad enzimática de estas proteínas es sensible al estado redox intracelular.

Por lo tanto, nuestros resultados experimentales indican que, en concreto para las proteínas AKR, la disminución de los niveles de GSH intracelular podría suponer una estrategia para mejorar los efectos biológicos de la PGA<sub>1</sub> sobre estas proteínas.

## **9.- POSIBLES MECANISMOS DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE PGA<sub>1</sub> EN LAS CÉLULAS A549**

Las primeras demostraciones de los efectos antiproliferativos y antineoplásicos de las PGAs se publicaron en los años 80. Se comprobó que, tras el tratamiento de diferentes líneas celulares tumorales con PGAs, se producía una inhibición de la proliferación y un aumento en la diferenciación celular (Bregman and Meyskens, 1983; Honn et al., 1981). Actualmente, las PGAs son objeto de numerosos estudios destinados al desarrollo de derivados estructurales para su uso en terapias antitumorales (Ishikawa et al., 1998; Sasaki et al., 1999; Tanikawa et al., 1998).

Se han descrito diferentes mecanismos por los que las PGAs llevan a cabo sus efectos antitumorales. Uno de ellos es a través de la parada del ciclo celular en la fase G1, que se ha relacionado con la modulación de la expresión de diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular (Gorospe and Holbrook, 1996; Ishioka et al., 1988). Por otro lado, se ha descrito que las PGAs llevan a cabo sus efectos antitumorales mediante la inducción de apoptosis, a través de la activación de diferentes mediadores y rutas de señalización implicados en este tipo de muerte celular (Joubert et al., 2006; Lee et al., 2010; Liu et al., 2003).

Nuestros resultados obtenidos en los ensayos con MTT y Alamarblue muestran que tanto la PGA<sub>1</sub> como su análogo biotinilado disminuyen la viabilidad/proliferación de las células A549 (Figura 35). Estos efectos están asociados con un incremento en la proporción de células en fase G2/M del ciclo celular en nuestras condiciones experimentales, tal y como demuestran los ensayos de citometría de flujo (Figura 36). Además, la PGA<sub>1</sub> indujo apoptosis a una concentración de 30  $\mu$ M, y necrosis a 60  $\mu$ M (Figura 37).

Estos resultados concuerdan con los publicados en la literatura. Por un lado se ha descrito que los efectos de las PGAs pueden depender del tipo celular. Joubert y cols. obtuvieron respuestas diferentes tras el tratamiento de las células MCF-7 y Hela con PGA<sub>2</sub>, produciéndose parada de ciclo celular en fase G2/M en células MCF-7 y en fase G1/S en células Hela (Joubert et al., 2003). Además, se ha descrito que el efecto citotóxico de las PGAs depende de la concentración utilizada. El tratamiento con PGAs indujo citotoxicidad cuando se utilizaban dosis por encima de 10  $\mu$ g/ml (30  $\mu$ M), y cuando se utilizaban concentraciones inferiores, las células se recuperaron después de varios días tras el tratamiento (Ishioka et al., 1988).

Una vez comprobado el carácter citotóxico de la PGA<sub>1</sub> sobre las A549, estudiamos su efecto sobre la capacidad tumorigénica de estas células. Mediante ensayos *in vitro* demostramos que la PGA<sub>1</sub> inhibe la migración celular (Figura 38), así como la formación de colonias en agar de las células A549 (Figura 39).

La proteína AKR1B10 está implicada en la inducción de la proliferación celular mediante la disminución de la síntesis del ácido retinoico, el cual regula procesos de proliferación y diferenciación celular (Gallego et al., 2006). Se ha descrito que el silenciamiento del gen que codifica la AKR1B10, produce una disminución de la formación de colonias en una línea celular de carcinoma colorrectal (Yan et al., 2007). Dado que la PGA<sub>1</sub> inhibe la actividad AKR en las A549, y la proteína AKR1B10 es la forma mayoritaria de las AKR expresada en estas células, los efectos inhibidores de la PGA<sub>1</sub> sobre la proliferación y tumorigenicidad podrían estar, en parte, mediados por la inhibición de la proteína AKR1B10. Sin embargo esta hipótesis requiere confirmación.

## **10.- EFECTO DE LA $PGA_1$ EN LA QUIMIORRESISTENCIA DE LAS CÉLULAS A549 A FÁRMACOS ANTITUMORALES: DOXORRUBICINA**

La resistencia a múltiples compuestos (MDR) es el proceso por el que las células desarrollan resistencia a diferentes compuestos estructuralmente no relacionados. Clínicamente, el fenotipo MDR implica que un paciente no responde al tratamiento que se le está aplicando, y es la principal causa de muerte de pacientes con cáncer. Este fenotipo puede afectar a numerosos tipos de tumores como mama, pulmón, ovario, etc., Por lo tanto, es de elevada importancia el estudiar y conocer los mecanismos implicados en el desarrollo de MDR con el fin de encontrar posibles terapias efectivas para su tratamiento.

Los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de MDR incluyen la acción de proteínas transportadoras de membrana, la modulación de los niveles intracelulares de GSH, la actividad de enzimas GST y otras enzimas implicadas en detoxificación, la acción de topoisomerasas, los mecanismos de reparación del DNA, etc. La proteína AKR1B10 está implicada en quimiorresistencia mediante el metabolismo de compuestos antitumorales con grupos carbonilo, como DOX y DAN, a sus correspondientes alcoholes, menos activos (Martin et al., 2006).

Resultados procedentes de diferentes grupos de investigación han demostrado que las PGAs y compuestos derivados son potenciales agentes antitumorales eficaces en situaciones de quimiorresistencia (Kikuchi et al., 1992; Sasaki et al., 1999).

En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento de las células A549 con DOX produjo un incremento en la proporción de células en fase G2/M del ciclo celular (Figura 40A), indicativo de una parada del ciclo en este punto. Estos resultados concuerdan con los efectos de DOX comúnmente descritos en la literatura (Litwiniec et al., 2010). Es interesante destacar que el tratamiento de las células A549 con  $PGA_1$  produjo una potenciación del efecto de DOX sobre el ciclo celular (Figura 40B).

Por otro lado, exploramos el efecto de  $PGA_1$  sobre la acumulación de DOX en las células A549. Mediante técnicas de microscopía confocal y citometría de flujo comprobamos que el tratamiento con  $PGA_1$  produjo un aumento en la acumulación de DOX en las células A549, en comparación con el tratamiento de DOX por sí sola (Figura 41A y B).

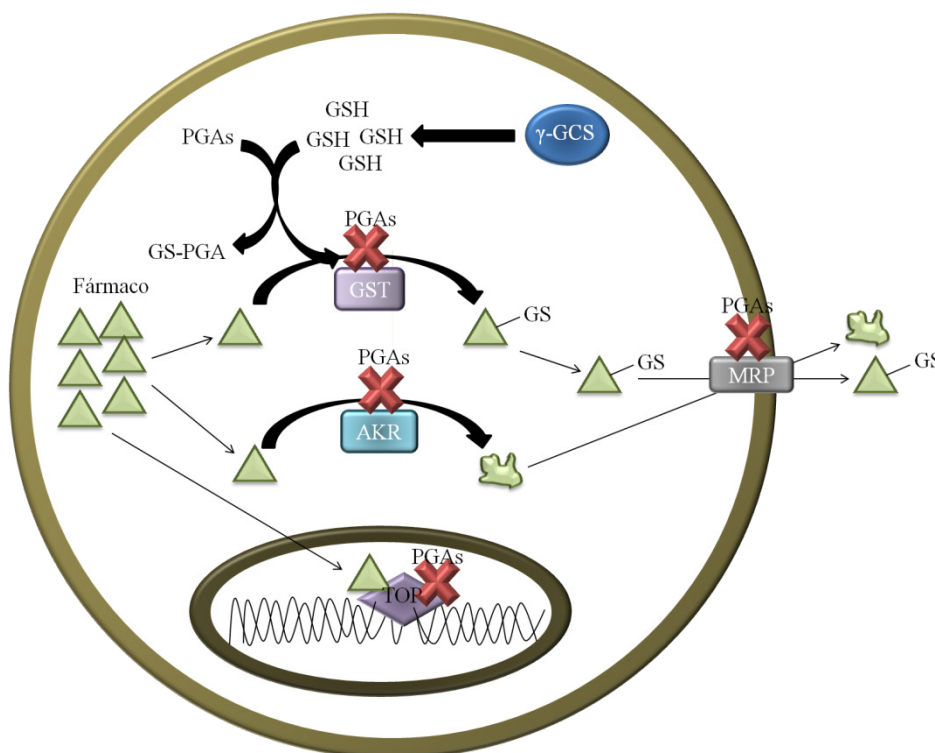
El compuesto AD-5467 es un inhibidor de la enzima AKR1B1. Nuestros resultados demostraron que también inhibe la actividad de la AKR1B10 expresada en

células COS-7 (Figura 30B). El hecho de que este inhibidor reprodujera los efectos de  $\text{PGA}_1$  incrementando el efecto de DOX sobre el ciclo celular (Figura 40C) y la acumulación de DOX en las células A549 (Figura 41C) apoya la interpretación de que la potenciación de los efectos de DOX por  $\text{PGA}_1$  en las células A549 podría estar en parte mediada por la inhibición de la proteína AKR1B10 por  $\text{PGA}_1$ , lo que provocaría una disminución del metabolismo de la DOX, y un aumento de sus efectos biológicos. Sin embargo, existen otros procesos que participan en el desarrollo de quimiorresistencia que podrían estar implicados en la potenciación de los efectos de DOX por  $\text{PGA}_1$  en las células A549, incluyendo su potencial interacción con transportadores de conjugados de fármacos. En la figura 46 se muestra un esquema de varios posibles mecanismos por los que las PGAs ejercen efectos antitumorales en situaciones de quimiorresistencia.

El principal mecanismo de quimiorresistencia es la exportación de fármacos mediante los transportadores de tipo ABC. Estas proteínas se expresan en membrana plasmática, aunque también pueden expresarse en núcleo o en otros compartimentos intracelulares. Estos transportadores pueden exportar fármacos, reduciendo su concentración intracelular y por lo tanto, disminuyendo su potencia. El primer transportador de tipo ABC descubierto fue la proteína MDR1 o glicoproteína-P. Los compuestos antineoplásicos sustrato de este transportador son las antraciclinas, las epipodofilotoxinas, el metotrexato, etc. (Juliano, 1976). Otros transportadores de tipo ABC son las proteínas denominadas MRP1. Esta proteína tiene como sustratos conjugados de fármacos con GSH (Evers et al., 1997; Lage, 2008). Existen numerosas evidencias que demuestran que células resistentes a compuestos como cisplatino o DOX, expresan niveles elevados de proteínas MRP (Akimaru et al., 1996). Dado que las PGAs han resultado efectivas en líneas celulares resistentes a este tipo de compuestos (Sasaki et al., 1991), estas evidencias sugieren que la  $\text{PGA}_1$  podría reducir la quimiorresistencia mediante la inhibición de proteínas MRP, lo que reduciría la exportación de los fármacos utilizados en terapias antineoplásicas, y por lo tanto la consecuente mejora de sus efectos antitumorales.

De hecho se ha descrito que la  $\text{PGA}_1$  puede actuar como inhibidor de la proteína MRP1. Se demostró en un experimento con células de médula ósea de pacientes con leucemia resistentes a agentes antitumorales, que el tratamiento de las células con  $\text{PGA}_1$  aumentaba la acumulación intracelular de un compuesto fluorescente sustrato de la proteína MRP1 (Szakacs et al., 1998).

El metabolismo del GSH es otro de los sistemas principalmente implicados en el desarrollo de quimiorresistencia (Tew, 1994). Las PGAs regulan a varios niveles las rutas de metabolismo del GSH. Por un lado, se ha descrito que las PGAs pueden inhibir a las enzimas GST, tanto por interacción no covalente, como por interacción covalente con residuos de cisteína presentes en estas proteínas (Sánchez-Gómez et al., 2007; van Iersel et al., 1999). Además, en células de melanoma humano, la presencia de  $\text{PGA}_2$  produjo una disminución de los niveles de GSH intracelulares, una disminución en la formación de conjugados con GSH y de la exportación al medio extracelular (van Iersel et al., 1999).



**Figura 46.- Algunos potenciales mecanismos por los que las PGAs interfieren en la quimiorresistencia celular a fármacos antitumorales.** Tras la entrada de un fármaco en la célula, éste puede ser metabolizado por diferentes vías. Por un lado, puede ser conjugado con GSH, proceso catalizado por enzimas GST. Los aductos con GSH pueden ser posteriormente exportados al exterior celular mediante proteínas MRP/MDR. Por otro lado, las AKR pueden metabolizar fármacos con grupos carbonilo a compuestos menos activos, susceptibles también de ser exportados al exterior celular. Las PGAs ejercen efectos antitumorales en situaciones de quimiorresistencia, que podrían estar mediados por la inhibición de enzimas GST, AKR o de proteínas MRP. Además, se ha propuesto que las PGAs pueden disminuir los niveles de GSH intracelulares mediante distintos mecanismos. También pueden inhibir enzimas top, lo que podría contribuir al efecto citotóxico de estos compuestos en la célula.

Las topoisomerasas (top) son enzimas que tienen la función de la relajación y el desenrollamiento de la doble hélice de DNA durante la replicación y la expresión génica. Se ha descrito un papel oncogénico para estas enzimas, ya que se han detectado niveles elevados en diferentes líneas celulares tumorales, por lo que se las ha definido como un buen factor pronóstico en cáncer. Las top, principalmente la top-II son una importante diana de un gran número de compuestos ampliamente utilizados actualmente en las terapias antitumorales. Estos compuestos actúan bien bloqueando el complejo top-DNA, lo que genera la acumulación de roturas en la doble hélice de DNA (venenos) o bien interaccionando con la enzima, lo que inhibe la formación del complejo (inhibidores catalíticos). Ejemplos de estos compuestos son las antraciclinas, como DOX y DAN, o las epipodofilotoxinas, como etopóxido.

Existen evidencias que definen que la sensibilidad de una célula a este tipo de compuestos es directamente proporcional a los niveles de top-II. El fenotipo MDR se ha asociado en algunos casos a una disminución de los niveles de la top-II o de su actividad debido a mutaciones (Kellner et al., 2002). Se ha descrito que las PGAs, tanto  $PGA_1$  como  $PGA_2$ , inhiben la enzima top-II, aunque a concentraciones muy elevadas ( $IC_{50} = 98 \mu M$  y  $75 \mu M$ , respectivamente) (Suzuki et al., 1998a). Estas evidencias sugieren que las top podrían ser una nueva diana por la que las PGAs ejercen efectos antitumorales y resultan efectivas en situaciones de quimiorresistencia.

Además de la proteína AKR1B10, existen otras enzimas AKR implicadas en el desarrollo de quimiorresistencia.

La proteína AKR1B1 se encuentra sobreexpresada en algunos tipos de tumores, como hígado, mama, útero, etc. (Saraswat et al., 2006). Se ha descrito que la inhibición de la AKR1B1 sobreexpresada en células Hela o HepG2, aumentó la citotoxicidad de compuestos antitumorales, como cisplatino o DOX (Lee et al., 2002; Lee et al., 2001).

De la subfamilia AKR1C, existen 4 miembros expresados en humanos, AKR1C1, 2, 3 y 4, que comparten un alto grado de identidad de secuencia entre ellos (84-98%). Fisiológicamente, estas enzimas están implicadas en la reducción de 17-ceto y 20-cetoesteroides, regulando por tanto los niveles de progesterona y estrógenos. Además, participan en la síntesis de PG. Recientemente se han obtenido numerosas evidencias que implican a estas proteínas en el desarrollo de tumores dependientes de hormonas, como ciertos tumores de endometrio, cuello uterino o próstata (Rizner, 2012). Además, estas proteínas pueden metabolizar compuestos antitumorales como



oracina y DOX, a sus metabolitos menos activos, participando también en el desarrollo de quimiorresistencia (Novotna et al., 2008).

La proteína AKR mayoritaria expresada en células A549 es la AKR1B10, sin embargo, estas células también expresan las proteínas AKR1B1, AKR1C1, 2, 3 y 4. La inhibición de la actividad AKR por PGA<sub>1</sub> en las células A594 puede ser debida a la inhibición de AKR1B10, pero también a la inhibición de las otras proteínas AKR presentes en estas células. Dado que estas proteínas también están implicadas en tumorigénesis y quimiorresistencia, la inhibición simultánea de estas enzimas podría suponer una terapia más efectiva en el tratamiento de ciertos tumores, y en la prevención de quimiorresistencia a compuestos antitumorales.

La identificación de las proteínas AKR como nuevas dianas de las cyPG de la serie A, supone un hallazgo importante, ya que por un lado, desvela un nuevo mecanismo por el que estos compuestos pueden llevar a cabo sus acciones antitumorales y además, propone otra vía por la que estos compuestos mejoran el efecto de algunos fármacos en situaciones de quimiorresistencia. Estos datos son una evidencia más que demuestra la importancia y el potencial de las PGAs como fármacos antitumorales y apoyan su uso como adyuvantes en las terapias ya existentes con objeto de mejorar los resultados en situaciones de desarrollo de MDR.

Los resultados expuestos a lo largo de este trabajo, partiendo de una observación bioquímica sobre el mecanismo de acción y la selectividad de lípidos electrófilos, aportan información sobre un nuevo tipo de inhibidores de las enzimas AKR y proponen el interés de un estudio más detallado de su potencial *in vivo*.

## **Conclusiones**



Como resultado de este trabajo, en el que se ha caracterizado la interacción de la  $\text{PGA}_1$  con las proteínas AKR1B1 y AKR1B10, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- La AKR1B1 es diana para la unión de  $\text{PGA}_1$  tanto *in vitro* como en células. Esta interacción conlleva la inhibición de la enzima, que tiene un componente irreversible.
- 2.- Otras PG, incluyendo la  $15\text{-d-PGJ}_2$  y la  $\text{PGE}_2$ , y compuestos análogos como el CAY10410, inhiben la actividad enzimática de la proteína AKR1B1 *in vitro*. De los compuestos ensayados, los que poseen al menos un carbono electrófilo en su estructura bloquean además la unión de la  $\text{PGA}_1$ -B a la enzima.
- 3.- La presencia de NADPH o  $\text{NADP}^+$  protege a la proteína AKR1B1 de la inhibición por  $\text{PGA}_1$ . Este efecto podría producirse por la alteración de la interacción de la PG con la proteína.
- 4.- La  $\text{PGA}_1$  se une covalentemente a la proteína AKR1B10 a través del residuo de Cys299 presente en el centro activo de la enzima. Los residuos His111 y Tyr49 contribuyen a esta interacción.
- 5.- La  $\text{PGA}_1$  y su análogo biotinilado inhiben la actividad enzimática de la proteína AKR1B10 expresada en células COS-7. Esta inhibición requiere la presencia del residuo de Cys299. Los residuos Cys299, His111 y Tyr49 son esenciales para la actividad enzimática de la AKR1B10.
- 6.- La  $\text{PGA}_1$ -B modifica a la proteína AKR1B10 endógena e inhibe la actividad enzimática AKR en las células A549 con una potencia similar a la de la  $\text{PGA}_1$ .
- 7.- La inhibición de la síntesis de GSH en las células A549 potencia tanto la modificación de proteínas de la superfamilia de la AKR por  $\text{PGA}_1$ -B, como la inhibición de la actividad AKR por  $\text{PGA}_1$  y  $\text{PGA}_1$ -B.
- 8.- La  $\text{PGA}_1$  reduce la viabilidad de las células A549. Este efecto se asocia con un aumento en la población de células en fase G2/M del ciclo celular, y con un aumento en la población de células apoptóticas tempranas y necróticas.

**9.-** La  $\text{PGA}_1$  inhibe la migración *in vitro* y el crecimiento de colonias en agarosa de las células A549.

**10.-** La  $\text{PGA}_1$  potencia la acumulación de DOX y el aumento de la proporción de células en fase G2/M del ciclo celular inducido por DOX en las células A549.

**11.-** El inhibidor de la aldosa reductasa, AD-5467, reproduce los efectos de la  $\text{PGA}_1$  sobre la potenciación de la acumulación de DOX y el aumento en la proporción de células en fase G2/M del ciclo celular en las células A549. Este resultado sugiere que la potenciación de los efectos de DOX por  $\text{PGA}_1$  podría estar mediada en parte por la inhibición de la proteína AKR1B10.

## **Bibliografía**



- Aguilera, A., Yáñez-Mo, M., Selgas, R., Sánchez-Madrid, F., López-Cabrera, M., 2005. Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs*. 6, 262-8.
- Akimaru, K., Kuo, M. T., Furuta, K., Suzuki, M., Noyori, R., Ishikawa, T., 1996. Induction of MRP/GS-X pump and cellular resistance to anticancer prostaglandins. *Cytotechnology*. 19, 221-7.
- Aldini, G., Carini, M., Vistoli, G., Shibata, T., Kusano, Y., Gamberoni, L., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Uchida, K., 2007. Identification of actin as a 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 target in neuroblastoma cells: mass spectrometric, computational, and functional approaches to investigate the effect on cytoskeletal derangement. *Biochemistry*. 46, 2707-18.
- Amici, C., Sistonen, L., Santoro, M. G., Morimoto, R. I., 1992. Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 6227-31.
- Ananthakrishnan, R., Kaneko, M., Hwang, Y. C., Quadri, N., Gomez, T., Li, Q., Caspersen, C., Ramasamy, R., 2009. Aldose reductase mediates myocardial ischemia-reperfusion injury in part by opening mitochondrial permeability transition pore. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296, H333-41.
- Atsmon, J., Freeman, M. L., Meredith, M. J., Sweetman, B. J., Roberts, L. J., 2nd, 1990. Conjugation of 9-deoxy-delta 9,delta 12(E)-prostaglandin D2 with intracellular glutathione and enhancement of its antiproliferative activity by glutathione depletion. *Cancer Res*. 50, 1879-85.
- Balendiran, G. K., 2009. Fibrates in the chemical action of daunorubicin. *Curr Cancer Drug Targets*. 9, 366-9.
- Beyer-Mears, A., Mistry, K., Diecke, F. P., Cruz, E., 1996. Zopolrestat prevention of proteinuria, albuminuria and cataractogenesis in diabetes mellitus. *Pharmacology*. 52, 292-302.
- Bhatnagar, A., Das, B., Gavva, S. R., Cook, P. F., Srivastava, S. K., 1988. The kinetic mechanism of human placental aldose reductase and aldehyde reductase II. *Arch Biochem Biophys*. 261, 264-74.
- Bhuyan, B. K., Adams, E. G., Badiner, G. J., Li, L. H., Barden, K., 1986. Cell cycle effects of prostaglandins A1, A2, and D2 in human and murine melanoma cells in culture. *Cancer Res*. 46, 1688-93.
- Bickley, J. F., Ciucci, A., Evans, P., Roberts, S. M., Ross, N., Santoro, M. G., 2004. Reactions of some cyclopentenones with selected cysteine derivatives and biological activities of the product thioethers. *Bioorg Med Chem*. 12, 3221-7.
- Blanco, M., Moro, M., Dávalos, A., Leira, R., Castellanos, M., Serena, J., Vivancos, J., Rodriguez-Yáñez, M., Lizasoain, I., Castillo, J., 2005. Increased plasma levels of 15-Deoxy-Prostaglandin J2 are associated with good outcome in acute atherothrombotic ischemic stroke. *Stroke*. 36, 1189-1194.
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B., Glineur, C., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 85, 267-73.
- Blomhoff, R., Blomhoff, H., 2006. Overview of Retinoid Metabolism and Function. *J Neurobiol*. 66, 606-30.
- Bogaards, J. J., Venekamp, J. C., van Bladeren, P. J., 1997. Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione, catalyzed by the



- human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem Res Toxicol.* 10, 310-7.
- Borhani, D. W., Harter, T. M., Petrash, J. M., 1992. The crystal structure of the aldose reductase.NADPH binary complex. *J Biol Chem.* 267, 24841-7.
- Bregman, M. D., Meyskens, F. L., Jr., 1983. Inhibition of human malignant melanoma colony-forming cells in vitro by prostaglandin A1. *Cancer Res.* 43, 1642-5.
- Breton, J., Gage, M. C., Hay, A. W., Keen, J. N., Wild, C. P., Donnellan, C., Findlay, J. B., Hardie, L. J., 2008. Proteomic screening of a cell line model of esophageal carcinogenesis identifies cathepsin D and aldo-keto reductase 1C2 and 1B10 dysregulation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *J Proteome Res.* 7, 1953-62.
- Bui, T., Kuo, C., Rotwein, P., Straus, D. S., 1997. Prostaglandin A2 specifically represses insulin-like growth factor-I gene expression in C6 rat glioma cells. *Endocrinology.* 138, 985-93.
- Cagen, L. M., Pisano, J. J., Ketley, J. N., Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1975. The conjugation of prostaglandin A1 and glutathione catalyzed by homogeneous glutathione s-transferases from human and rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 398, 205-8.
- Cao, D., Fan, S. T., Chung, S. S., 1998. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem.* 273, 11429-35.
- Cassidy, PB., Edes, K., Nelson, CC., Parsawar, K., Fitzpatrick, FA., Moos, PJ., 2006. Thioredoxin reductase is required for the inactivation of tumor suppressor p53 and for apoptosis induced by endogenous electrophiles. *Carcinogenesis.* 12, 2538-49.
- Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F. J., Pérez-Sala, D., 2001. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem.* 276, 35530-6.
- Crosas, B., Hyndman, D. J., Gallego, O., Martras, S., Pares, X., Flynn, T. G., Farres, J., 2003. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem J.* 373, 973-9.
- Chandra, A., Srivastava, S., Petrash, J. M., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., 1997a. Active site modification of aldose reductase by nitric oxide donors. *Biochim Biophys Acta.* 1341, 217-22.
- Chandra, A., Srivastava, S., Petrash, J. M., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., 1997b. Modification of aldose reductase by S-nitrosoglutathione. *Biochemistry.* 36, 15801-9.
- Chatzopoulou, M., Mamadou, E., Juskova, M., Koukoulitsa, C., Nicolaou, I., Stefek, M., Demopoulos, V. J., 2011. Structure-activity relations on [1-(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol-3-yl]phenylmethanone. The effect of methoxy substitution on aldose reductase inhibitory activity and selectivity. *Bioorg Med Chem.* 19, 1426-33.
- Chen, Y., Morrow, J. D., Roberts, L. J., 2nd, 1999. Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem.* 274, 10863-8.
- Chiang, P. C., Kung, F. L., Huang, D. M., Li, T. K., Fan, J. R., Pan, S. L., Shen, Y. C., Guh, J. H., 2006. Induction of Fas clustering and apoptosis by coral prostanoid in human hormone-resistant prostate cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 542, 22-30.

- Choi, A. M., Fargnoli, J., Carlson, S. G., Holbrook, N. J., 1992. Cell growth inhibition by prostaglandin A2 results in elevated expression of gadd153 mRNA. *Exp Cell Res.* 199, 85-9.
- Chung, Y. T., Matkowskyj, K. A., Li, H., Bai, H., Zhang, W., Tsao, M. S., Liao, J., Yang, G. Y., 2012. Overexpression and oncogenic function of aldo-keto reductase family 1B10 (AKR1B10) in pancreatic carcinoma. *Mod Pathol.* 25, 758-66.
- Covey, TM., Edes, K., Coombs, GS., Virshup, DM., Fitzpatrick, FA., 2010. Alkylation of the tumor suppressor PTEN activates Akt and  $\beta$ -catenin signaling: a mechanism linking inflammation and oxidative stress with cancer. *PLoS One.* 21;5(10):e13545.
- Del Corso, A., Dal Monte, M., Vilardo, P. G., Cecconi, I., Moschini, R., Banditelli, S., Cappiello, M., Tsai, L., Mura, U., 1998. Site-specific inactivation of aldose reductase by 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys.* 350, 245-8.
- Díez-Dacal, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Timms, J. F., Coderch, C., Gago, F., Pérez-Sala, D., 2011. Identification of aldo-keto reductase AKR1B10 as a selective target for modification and inhibition by prostaglandin A(1): implications for antitumoral activity. *Cancer Res.* 71, 4161-71.
- Díez-Dacal, B., Pérez-Sala, D., 2010. Anti-inflammatory prostanoids: focus on the interactions between electrophile signaling and resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal.* 10, 655-75.
- Díez-Dacal, B., Pérez-Sala, D., 2012. A-class prostaglandins: early findings and new perspectives for overcoming tumor chemoresistance. *Cancer Lett.* 320, 150-7.
- Ebert, B., Kisiela, M., Wsol, V., Maser, E., 2011. Proteasome inhibitors MG-132 and bortezomib induce AKR1C1, AKR1C3, AKR1B1, and AKR1B10 in human colon cancer cell lines SW-480 and HT-29. *Chem Biol Interact.* 191, 239-49.
- Eisenbarth, G. S., Wellman, D. K., Lebovitz, H. E., 1974. Prostaglandin A1 inhibition of chondrosarcoma growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 60, 1302-8.
- Endo, S., Matsunaga, T., Kuwata, K., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Kitade, Y., Hara, A., 2010a. Chromene-3-carboxamide derivatives discovered from virtual screening as potent inhibitors of the tumour maker, AKR1B10. *Bioorg Med Chem.* 18, 2485-90.
- Endo, S., Matsunaga, T., Mamiya, H., Ohta, C., Soda, M., Kitade, Y., Tajima, K., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Hara, A., 2009. Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: endogenous substrates and inhibition by steroids. *Arch Biochem Biophys.* 487, 1-9.
- Endo, S., Matsunaga, T., Soda, M., Tajima, K., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Hara, A., 2010b. Selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by antiinflammatory N-phenylanthranilic acids and glycyrrhetic acid. *Biol Pharm Bull.* 33, 886-90.
- Evers, R., Cnubben, N. H., Wijnholds, J., van Deemter, L., van Bladeren, P. J., Borst, P., 1997. Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Lett.* 419, 112-6.
- Fidler, I. J., 2002. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation.* 70, 498-505.
- Fitzpatrickz, F. A., Wynalda, M. A., 1983. Albumin-catalyzed Metabolism of Prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem.* 258, 11713-11718.
- Forman, B. M., Chen, J., Evans, R. M., 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 4312-7.

- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., Evans, R. M., 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 83, 803-12.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 1, 2315-9.
- Fukumoto, S., Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., Iwanari, H., Hironaka, M., Ishikawa, Y., Niki, T., Sohara, Y., Kodama, T., Nishimura, M., Fukayama, M., Dosaka-Akita, H., Aburatani, H., 2005. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res*. 11, 1776-85.
- Fukushima, M., Kato, T., Ota, K., Arai, Y., Narumiya, N., Hayaishi, O., 1982. 9-deoxy-A'-prostaglandin D2, a prostaglandin D2 derivative with potent antineoplastic and weak smooth muscle-contracting activities. *Biochem biophys res commun*. 109, 626-33.
- Fukushima, S., Kishimoto, S., Takeuchi, Y., Fukushima, M., Suzuki, M., Furuta, K., Noyori, R., Sasaki, H., Kikuchi, Y., Nakano, M., Kurozumi, S., 1998. Pharmaceutical and pharmacological development of antitumor prostaglandins. *Nihon Rinsho*. 56, 663-9.
- Gallego, O., Belyaeva, O. V., Porte, S., Ruiz, F. X., Stetsenko, A. V., Shabrova, E. V., Kostereva, N. V., Farres, J., Pares, X., Kedishvili, N. Y., 2006. Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem J*. 399, 101-9.
- Gallego, O., Ruiz, F. X., Ardevol, A., Domínguez, M., Álvarez, R., de Lera, A. R., Rovira, C., Farres, J., Fita, I., Pares, X., 2007. Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 20764-9.
- Garzón, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Díez-Dacal, B., Sánchez-Gómez, F. J., Timms, J. F., Pérez-Sala, D., 2010. A biotinylated analog of the anti-proliferative prostaglandin A1 allows assessment of PPAR-independent effects and identification of novel cellular targets for covalent modification. *Chem Biol Interact*. 183, 212-21.
- Garzón, B., Oeste, C. L., Díez-Dacal, B., Pérez-Sala, D., 2011. Proteomic studies on protein modification by cyclopentenone prostaglandins: expanding our view on electrophile actions. *J Proteomics*. 74, 2243-63.
- Gayarre, J., Modificación de proteínas por lípidos electrófilos: selectividad e implicaciones biológicas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2007.
- Gayarre, J., Avellano, M. I., Sánchez-Gómez, F. J., Carrasco, M. J., Cañada, F. J., Pérez-Sala, D., 2007. Modification of proteins by cyclopentenone prostaglandins is differentially modulated by GSH in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 1096, 78-85.
- Gayarre, J., Sánchez, D., Sánchez-Gómez, F. J., Terrón, M. C., Llorca, O., Pérez-Sala, D., 2006. Addition of electrophilic lipids to actin alters filament structure. *Biochem Biophys Res Commun*. 349, 1387-93.
- Gayarre, J., Stamatakis, K., Renedo, M., Pérez-Sala, D., 2005. Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2: role of glutathione. *FEBS Lett*. 579, 5803-8.

- Gewirtz, D. A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 57, 727-41.
- Gharbi, S., Garzón, B., Gayarre, J., Timms, J., Pérez-Sala, D., 2007. Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin. *J Mass Spectrom.* 42, 1474-84.
- Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J., Willoughby, D. A., 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 5, 698-701.
- Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., Rossi, A. G., 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 3, 401-16.
- Golub, M. S., Zia, P. K., Horton, R., 1974. Metabolism of prostaglandins A1 and A2 by human whole blood. *Prostaglandins.* 8, 13-20.
- Gorospe, M., Holbrook, N. J., 1996. Role of p21 in prostaglandin A2-mediated cellular arrest and death. *Cancer Res.* 56, 475-9.
- Goto, S., Ihara, Y., Urata, Y., Izumi, S., Abe, K., Koji, T., Kondo, T., 2001. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. *Faseb J.* 15, 2702-14.
- Hamberg, M., Samuelsson, B., 1966. Prostaglandins in human seminal plasma. Prostaglandins and related factors 46. *J Biol Chem.* 241, 257-63.
- Hasuike, Y., Moriguchi, R., Hata, R., Miyagawa, K., Kuragano, T., Aizawa, M., Yamamoto, S., Yanase, K., Izumi, M., Tanimoto, T., Nakanishi, T., 2007. Role of aldose reductase in the peritoneal changes of patients undergoing peritoneal dialysis. *Am J Nephrol.* 27, 622-9.
- Hers, H. G., 1956. [The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles]. *Biochim Biophys Acta.* 22, 202-3.
- Hirata, Y., Hayashi, H., Ito, S., Kikawa, Y., Ishibashi, M., Sudo, M., Miyazaki, H., Fukushima, M., Narumiya, S., Hayaishi, O., 1988. Occurrence of 9-deoxy-delta 9,delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2 in human urine. *J Biol Chem.* 263, 16619-25.
- Holbrook, N. J., Carlson, S. G., Choi, A. M., Fargnoli, J., 1992. Induction of HSP70 gene expression by the antiproliferative prostaglandin PGA2: a growth-dependent response mediated by activation of heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol.* 12, 1528-34.
- Honn, K., Marnett, L., 1985. Requirement of a reactive  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl for inhibition of tumor growth and induction of differentiation by "A" series prostaglandins. *Biochemical and biophysical research communications.* 129, 34-40.
- Honn, K. V., Bockman, R. S., Marnett, L. J., 1981. Prostaglandins and cancer: a review of tumor initiation through tumor metastasis. *Prostaglandins.* 21, 833-64.
- Hwang, Y. C., Kaneko, M., Bakr, S., Liao, H., Lu, Y., Lewis, E. R., Yan, S., Ii, S., Itakura, M., Rui, L., Skopicki, H., Homma, S., Schmidt, A. M., Oates, P. J., Szabolcs, M., Ramasamy, R., 2004. Central role for aldose reductase pathway in myocardial ischemic injury. *Faseb J.* 18, 1192-9.
- Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., Penning, T. M., 2003. The aldose reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact.* 143-144, 621-31.
- Inskeep, P. B., Ronfeld, R. A., Peterson, M. J., Gerber, N., 1994. Pharmacokinetics of the aldose reductase inhibitor, zopolrestat, in humans. *J Clin Pharmacol.* 34, 760-6.

- Ishihara, S., Rumi, M. A., Okuyama, T., Kinoshita, Y., 2004. Effect of prostaglandins on the regulation of tumor growth. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 4, 379-87.
- Ishii, H., Tada, H., Isogai, S., 1998. An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor-beta and protein kinase C activity in cultured mesangial cells. *Diabetologia*. 41, 362-4.
- Ishikawa, T., Akimaru, K., Nakanishi, M., Tomokiyo, K., Furuta, K., Suzuki, M., Noyori, R., 1998. Anti-cancer-prostaglandin-induced cell-cycle arrest and its modulation by an inhibitor of the ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump (GS-X pump). *Biochem J*. 336, 569-76.
- Ishioka, C., Kanamaru, R., Sato, T., Dei, T., Konishi, Y., Asamura, M., Wakui, A., 1988. Inhibitory effects of prostaglandin A2 on c-myc expression and cell cycle progression in human leukemia cell line HL-60. *Cancer Res*. 48, 2813-8.
- Iwata, T., Sato, S., Jimenez, J., McGowan, M., Moroni, M., Dey, A., Ibaraki, N., Reddy, V. N., Carper, D., 1999. Osmotic response element is required for the induction of aldose reductase by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 274, 7993-8001.
- Jaffe, B. M., Behrman, H. R., Parker, C. W., 1973. Radioimmunoassay measurement of prostaglandins E, A, and F in human plasma. *J Clin Invest*. 52, 398-405.
- Jez, J. M., Flynn, T. G., Penning, T. M., 1997. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol*. 54, 639-47.
- Joubert, A., Bianchi, P., Maritz, C., Joubert, F., 2006. Influence of prostaglandin A2 on Bax, Bcl-2 and PCNA expression in MCF-7 cells. *Biomed Res*. 27, 157-62.
- Joubert, A., Maritz, C., Joubert, F., 2005. Influence of prostaglandin A2 and 2-methoxyestradiol on Bax and Bcl-2 expression levels in cervical carcinoma cells. *Biomed Res*. 26, 87-90.
- Joubert, A. M., Panzer, A., Bianchi, P. C., Lottering, M. L., 2003. The effects of prostaglandin A2 on cell growth, cell cycle status and apoptosis induction in HeLa and MCF-7 cells. *Cancer Lett*. 191, 203-9.
- Juliano, R., 1976. Drug-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells possess an altered cell surface carbohydrate component. *J Supramol Struct*. 4, 521-6.
- Kaiserova, K., Srivastava, S., Hoetker, J. D., Awe, S. O., Tang, X. L., Cai, J., Bhatnagar, A., 2006. Redox activation of aldose reductase in the ischemic heart. *J Biol Chem*. 281, 15110-20.
- Kaiserova, K., Tang, X. L., Srivastava, S., Bhatnagar, A., 2008. Role of nitric oxide in regulating aldose reductase activation in the ischemic heart. *J Biol Chem*. 283, 9101-12.
- Kansanen, E., Jyrkkanen, H. K., Levonen, A. L., 2012. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med*. 52, 973-82.
- Kansanen, E., Kivela, A. M., Levonen, A. L., 2009. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med*. 47, 1310-7.
- Karin, M., 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 441, 431-6.
- Kato, T., Fukushima, M., Kurozumi, S., Noyori, R., 1986. Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 46, 3538-42.
- Kellner, U., Sehested, M., Jensen, P. B., Gieseler, F., Rudolph, P., 2002. Culprit and victim - DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol*. 3, 235-43.

- Kikuchi, Y., Kita, T., Miyauchi, M., Hirata, J., Sasa, H., Nagata, I., Fukushima, M., 1992. Adjuvant effects of antineoplastic prostaglandins to cisplatin in nude mice bearing human ovarian cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 118, 453-7.
- Kim, E. H., Na, H. K., Kim, D. H., Park, S. A., Kim, H. N., Song, N. Y., Surh, Y. J., 2008a. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 induces COX-2 expression through Akt-driven AP-1 activation in human breast cancer cells: a potential role of ROS. *Carcinogenesis.* 29, 688-95.
- Kim, H. Y., Kim, J. R., Kim, H. S., 2008b. Upregulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-10 by prostaglandin A1 in mouse peritoneal macrophages. *J Microbiol Biotechnol.* 18, 1170-8.
- Kinoshita, J. H., Kador, P., Catiles, M., 1981. Aldose reductase in diabetic cataracts. *JAMA.* 246, 257-61.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y., Yamamoto, M., 2009. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol.* 29, 493-502.
- Koenitzer, J. R., Freeman, B. A., 2010. Redox signaling in inflammation: interactions of endogenous electrophiles and mitochondria in cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1203, 45-52.
- Koharudin, L. M., Liu, H., Di Maio, R., Kodali, R. B., Graham, S. H., Gronenborn, A. M., 2010. Cyclopentenone prostaglandin-induced unfolding and aggregation of the Parkinson disease-associated UCH-L1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 6835-40.
- Kondo, M., Shibata, T., Kumagai, T., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Sasaki, S., Iwata, M., Noguchi, N., Uchida, K., 2002. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2): the endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 7367-72.
- Lage, H., 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci.* 65, 3145-67.
- Lalier, L., Cartron, P.F., Olivier, C., Logé, C., Bougras, G., Robert, J.M., Oliver, L., Vallette, F.M., 2011. Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 528-37.
- Lee, E. K., Regenold, W. T., Shapiro, P., 2002. Inhibition of aldose reductase enhances HeLa cell sensitivity to chemotherapeutic drugs and involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *Anticancer Drugs.* 13, 859-68.
- Lee, J. B., Patak, R. V., Mookerjee, B. K., 1976. Renal prostaglandins and the regulation of blood pressure and sodium and water homeostasis. *Am J Med.* 60, 798-816.
- Lee, K. W., Ko, B. C., Jiang, Z., Cao, D., Chung, S. S., 2001. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs.* 12, 129-32.
- Lee, S. Y., Ahn, J. H., Ko, K. W., Kim, J., Jeong, S. W., Kim, I. K., Kim, H. S., 2010. Prostaglandin A2 activates intrinsic apoptotic pathway by direct interaction with mitochondria in HL-60 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91, 30-7.
- Lee, T. S., Tsai, H. L., Chau, L. Y., 2003. Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem.* 278, 19325-30.
- Lee, Y. S., Paek, K. S., Kang, E. S., Jang, H. S., Kim, H. J., Kang, Y. J., Kim, J. H., Lee, H. T., Lee, J. H., Chang, K. C., Nishinaka, T., Seo, H. G., 2005. Involvement of nuclear factor kappaB in up-regulation of aldose reductase gene

- expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 2297-309.
- Levonen, A. L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E. K., Dickinson, D. A., Zanoni, G., Morrow, J. D., Darley-USmar, V. M., 2004. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J.* 378, 373-82.
- Lin, D., Saleh, S., Liebler, D. C., 2008. Reversibility of covalent electrophile-protein adducts and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol.* 21, 2361-9.
- Litwiniec, A., Grzanka, A., Helmin-Basa, A., Gackowska, L., Grzanka, D., 2010. Features of senescence and cell death induced by doxorubicin in A549 cells: organization and level of selected cytoskeletal proteins. *J Cancer Res Clin Oncol.* 136, 717-36.
- Liu, H., Li, W., Ahmad, M., Miller, T. M., Rose, M. E., Poloyac, S. M., Uechi, G., Balasubramani, M., Hickey, R. W., Graham, S. H., 2011. Modification of ubiquitin-C-terminal hydrolase-L1 by cyclopentenone prostaglandins exacerbates hypoxic injury. *Neurobiol Dis.* 41, 318-28.
- Liu, J., Wen, G., Cao, D., 2009. Aldo-keto reductase family 1 member B1 inhibitors: old drugs with new perspectives. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 4, 246-53.
- Liu, J. D., Lin, S. Y., Ho, Y. S., Pan, S., Hung, L. F., Tsai, S. H., Lin, J. K., Liang, Y. C., 2003. Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol Carcinog.* 37, 16-24.
- Liu, S. Q., Bhatnagar, A., Ansari, N. H., Srivastava, S. K., 1993. Identification of the reactive cysteine residue in human placenta aldose reductase. *Biochim Biophys Acta.* 1164, 268-72.
- Liu, Z., Yan, R., Al-Salman, A., Shen, Y., Bu, Y., Ma, J., Luo, D. X., Huang, C., Jiang, Y., Wilber, A., Mo, Y. Y., Huang, M. C., Zhao, Y., Cao, D., 2012. Epidermal growth factor induces tumour marker AKR1B10 expression through activator protein-1 signalling in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem J.* 442, 273-82.
- Ma, J., Yan, R., Zu, X., Cheng, J. M., Rao, K., Liao, D. F., Cao, D., 2008. Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 283, 3418-23.
- MacLeod, A. K., McMahon, M., Plummer, S. M., Higgins, L. G., Penning, T. M., Igarashi, K., Hayes, J. D., 2009. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis.* 30, 1571-80.
- Martin, H. J., Breyer-Pfaff, U., Wsol, V., Venz, S., Block, S., Maser, E., 2006. Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab Dispos.* 34, 464-70.
- Martin, H. J., Maser, E., 2009. Role of human aldo-keto-reductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. *Chem Biol Interact.* 178, 145-50.
- Martínez, A. E., Sánchez-Gómez, F. J., Díez-Dacal, B., Oeste, C. L., Pérez-Sala, D., 2012. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 exerts pro- and anti-inflammatory effects in mesangial cells in a concentration-dependent manner. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 11, 58-65.
- Matsunaga, T., Endo, S., Soda, M., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Tajima, K., Hara, A., 2009. Potent and selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by

- bisdemethoxycurcumin: probing the active site of the enzyme with molecular modeling and site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 389, 128-32.
- Meijer, C., Mulder, N. H., Hospers, G. A., Uges, D. R., de Vries, E. G., 1990. The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer.* 62, 72-7.
- Milne, G. L., Musiek, E. S., Morrow, J. D., 2005. The cyclopentenone (A2/J2) isoprostanes - unique, highly reactive products of arachidonate peroxidation. *Antioxid Redox Signal.* 7, 210-20.
- Milne, G. L., Yin, H., Hardy, K. D., Davies, S. S., Roberts, L. J., 2nd, 2011. Isoprostane generation and function. *Chem Rev.* 111, 5973-96.
- Mindnich, R. D., Penning, T. M., 2009. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum Genomics.* 3, 362-70.
- Monneret, G., Li, H., Vasilescu, J., Rokach, J., Powell, W. S., 2002. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandins D2 and J2 are potent activators of human eosinophils. *J Immunol.* 168, 3563-9.
- Mylari, B. L., Larson, E. R., Beyer, T. A., Zembrowski, W. J., Aldinger, C. E., Dee, M. F., Siegel, T. W., Singleton, D. H., 1991. Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl] methyl]-1-phthalazineacetic acid (zopolrestat) and congeners. *J Med Chem.* 34, 108-22.
- Narumiya, S., 2009. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *J Mol Med (Berl).* 87, 1015-22.
- Narumiya, S., Ohno, K., Fukushima, M., Fujiwara, M., 1987. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther.* 242, 306-11.
- Nishinaka, T., Miura, T., Okumura, M., Nakao, F., Nakamura, H., Terada, T., 2011. Regulation of aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2. *Chem Biol Interact.* 191, 185-91.
- Novotna, R., Wsol, V., Xiong, G., Maser, E., 2008. Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol Lett.* 181, 1-6.
- Noyori, R., Suzuki, M., 1993. Organic synthesis of prostaglandins: advancing biology. *Science.* 259, 44-5.
- Ohno, K., Fujiwara, M., Fukushima, M., Narumiya, S., 1986. Metabolic dehydration of prostaglandin E2 and cellular uptake of the dehydration product: correlation with prostaglandin E2-induced growth inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 139, 808-15.
- Ohtori, A., Yamamoto, Y., Tojo, K. J., 1991. Penetration and binding of aldose-reductase inhibitors in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 189-93.
- Parker, J., Ahrens, P. B., Ankel, H., 1995. Antiviral effect of cyclopentenone prostaglandins on vesicular stomatitis virus replication. *Antiviral Res.* 26, 83-96.
- Paumi, C. M., Wright, M., Townsend, A. J., Morrow, C. S., 2003. Multidrug resistance protein (MRP) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Delta(12,14)prostaglandin J2 in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry.* 42, 5429-37.
- Pavithra, L., Sreenath, K., Singh, S., Chattopadhyay, S., 2010. Heat-shock protein 70 binds to a novel sequence in 5' UTR of tumor suppressor SMAR1 and regulates its mRNA stability upon Prostaglandin A2 treatment. *FEBS Lett.* 584, 1187-92.



- Penning, T. M., Drury, J. E., 2007. Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys.* 464, 241-50.
- Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E., Cañada, F. J., 2003. Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem.* 278, 51251-60.
- Petrash, J. M., 2004. All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cell Mol Life Sci.* 61, 737-49.
- Petrash, J. M., Harter, T. M., Devine, C. S., Olins, P. O., Bhatnagar, A., Liu, S., Srivastava, S. K., 1992. Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Cys-80, -298, and -303. *J Biol Chem.* 267, 24833-40.
- Polet, H., Levine, L., 1974. Metabolism of Prostaglandins E, A, and C in Serum. *J Biol Chem.* 250, 351-357.
- Quinn, A. M., Harvey, R. G., Penning, T. M., 2008. Oxidation of PAH trans-dihydrodiols by human aldo-keto reductase AKR1B10. *Chem Res Toxicol.* 21, 2207-15.
- Ramana, K. V., 2011. ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme. *Biomol Concepts.* 2, 103-114.
- Ramana, K. V., Srivastava, S. K., 2010. Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, 17-20.
- Ramana, K. V., Tammali, R., Reddy, A. B., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., 2007. Aldose reductase-regulated tumor necrosis factor-alpha production is essential for high glucose-induced vascular smooth muscle cell growth. *Endocrinology.* 148, 4371-84.
- Ramasamy, R., Goldberg, I. J., 2010. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circ Res.* 106, 1449-58.
- Reddy, A. B., Ramana, K. V., Srivastava, S., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., 2009. Aldose reductase regulates high glucose-induced ectodomain shedding of tumor necrosis factor (TNF)-alpha via protein kinase C-delta and TNF-alpha converting enzyme in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 150, 63-74.
- Renedo, M., Gayarre, J., Garcia-Domínguez, C. A., Pérez-Rodríguez, A., Prieto, A., Cañada, F. J., Rojas, J. M., Pérez-Sala, D., 2007. Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry.* 46, 6607-16.
- Rizner, T. L., 2012. Enzymes of the AKR1B and AKR1C Subfamilies and Uterine Diseases. *Front Pharmacol.* 3, 34.
- Rossi, A., Elia, G., Santoro, M. G., 1997. Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 746-50.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., Santoro, M. G., 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature.* 403, 103-8.
- Ruepp, B., Bohren, K. M., Gabbay, K. H., 1996. Characterization of the osmotic response element of the human aldose reductase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 8624-9.
- Ruiz, F. X., Gallego, O., Ardevol, A., Moro, A., Domínguez, M., Álvarez, S., Álvarez, R., de Lera, A. R., Rovira, C., Fita, I., Pares, X., Farres, J., 2009. Aldo-keto

- reductases from the AKR1B subfamily: retinoid specificity and control of cellular retinoic acid levels. *Chem Biol Interact.* 178, 171-7.
- Sánchez-Gómez, F. J., Cernuda-Morollón, E., Stamatakis, K., Pérez-Sala, D., 2004. Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol.* 66, 1349-58.
- Sánchez-Gómez, F. J., Díez-Dacal, B., Pajares, M. A., Llorca, O., Pérez-Sala, D., 2010. Cyclopentenone prostaglandins with dienone structure promote cross-linking of the chemoresistance-inducing enzyme glutathione transferase P1-1. *Mol Pharmacol.* 78, 723-33.
- Sánchez-Gómez, F. J., Gayarre, J., Avellano, M. I., Pérez-Sala, D., 2007. Direct evidence for the covalent modification of glutathione-S-transferase P1-1 by electrophilic prostaglandins: implications for enzyme inactivation and cell survival. *Arch Biochem Biophys.* 457, 150-9.
- Santoro, M. G., 1997. Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends Microbiol.* 5, 276-81.
- Santoro, M. G., Crisari, A., Benedetto, A., Amici, C., 1986. Modulation of the growth of a human erythroleukemic cell line (K562) by prostaglandins: antiproliferative action of prostaglandin A. *Cancer Res.* 46, 6073-7.
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P. U., Suneetha, A., Rao Rao, T. S., Srinivasulu, M., Reddy, B., 2006. Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Med Sci Monit.* 12, CR525-29.
- Sasaki, H., Fukushima, M., 1994. Prostaglandins in the treatment of cancer. *Anticancer Drugs.* 5, 131-8.
- Sasaki, H., Niimi, S., Akiyama, M., Tanaka, T., Hazato, A., Kurozumi, S., Fukushima, S., Fukushima, M., 1999. Antitumor activity of 13,14-dihydro-15-deoxy-delta7-prostaglandin-A1-methyl ester integrated into lipid microspheres against human ovarian carcinoma cells resistant to cisplatin in vivo. *Cancer Res.* 59, 3919-22.
- Sasaki, H., Takada, K., Terashima, Y., Ekimoto, H., Takahashi, K., Tsuruo, T., Fukushima, M., 1991. Human ovarian cancer cell lines resistant to cisplatin, doxorubicin, and L-phenylalanine mustard are sensitive to delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2. *Gynecol Oncol.* 41, 36-40.
- Satow, R., Shitashige, M., Kanai, Y., Takeshita, F., Ojima, H., Jigami, T., Honda, K., Kosuge, T., Ochiya, T., Hirohashi, S., Yamada, T., 2010. Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 16, 2518-28.
- Sawyer, N., Cauchon, E., Chateauneuf, A., Cruz, R. P., Nicholson, D. W., Metters, K. M., O'Neill, G. P., Gervais, F. G., 2002. Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2. *Br J Pharmacol.* 137, 1163-72.
- Scuric, Z., Stain, S. C., Anderson, W. F., Hwang, J. J., 1998. New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 27, 943-50.
- Schopfer, F. J., Cipollina, C., Freeman, B. A., 2011. Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem Rev.* 111, 5997-6021.
- Serhan, C. N., 2008. Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators. *J Periodontol.* 79, 1520-6.
- Shan, Z. Z., Masuko-Hongo, K., Dai, S. M., Nakamura, H., Kato, T., Nishioka, K., 2004. A potential role of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J Biol Chem.* 279, 37939-50.

- Shen, Y., Zhong, L., Johnson, S., Cao, D., 2011. Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: a comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chem Biol Interact.* 191, 192-8.
- Shen, Y. C., Lo, K. L., Chang, J. Y., Lin, Y. S., Mendbayar, K., Kuo, Y. H., Lin, Y. C., 2010. New cytotoxic prostanoids from Taiwanese soft coral *Clavularia viridis*. *Chem Biodivers.* 7, 2702-8.
- Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Uchida, K., 2002. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem.* 277, 10459-66.
- Shibata, T., Yamada, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., Uchida, K., 2003. Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins. *J Biol Chem.* 278, 26046-54.
- Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T. S., Kakizuka, A., Jingami, H., 2005. Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 280, 14145-53.
- Shiraki, T., Kodama, T. S., Shiki, S., Nakagawa, T., Jingami, H., 2006. Spectroscopic analyses of the binding kinetics of 15d-PGJ2 to the PPARgamma ligand-binding domain by multi-wavelength global fitting. *Biochem J.* 393, 749-55.
- Soda, M., Hu, D., Endo, S., Takemura, M., Li, J., Wada, R., Ifuku, S., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Ohta, S., Yamamura, K., Toyooka, N., Hara, A., Matsunaga, T., 2012. Design, synthesis and evaluation of caffeic acid phenethyl ester-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human aldo-keto reductase 1B10. *Eur J Med Chem.* 48, 321-9.
- Spite, M., Serhan, C. N., 2010. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res.* 107, 1170-84.
- Srivastava, S., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., Ansari, N. H., 1995. Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 217, 741-6.
- Srivastava, S., Chandrasekar, B., Bhatnagar, A., Prabhu, S. D., 2002. Lipid peroxidation-derived aldehydes and oxidative stress in the failing heart: role of aldose reductase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283, H2612-9.
- Srivastava, S. K., Petrash, J. M., Sadana, I. J., Ansari, N. H., Partridge, C. A., 1982. Susceptibility of aldehyde and aldose reductases of human tissues to aldose reductase inhibitors. *Curr Eye Res.* 2, 407-10.
- Srivastava, S. K., Ramana, K. V., Bhatnagar, A., 2005. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev.* 26, 380-92.
- Srivastava, S. K., Ramana, K. V., Chandra, D., Srivastava, S., Bhatnagar, A., 2003. Regulation of aldose reductase and the polyol pathway activity by nitric oxide. *Chem Biol Interact.* 143-144, 333-40.
- Srivastava, S. K., Yadav, U. C., Reddy, A. B., Saxena, A., Tammali, R., Shoeb, M., Ansari, N. H., Bhatnagar, A., Petrash, M. J., Srivastava, S., Ramana, K. V., 2011. Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorders. *Chem Biol Interact.* 191, 330-8.
- Stamatakis, K., Sánchez-Gómez, F. J., Pérez-Sala, D., 2006. Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol.* 17, 89-98.

- Stein-Werblowsky, R., 1974. The effect of prostaglandin on tumour implantation. *Experientia*. 30, 957-9.
- Steuber, H., Zentgraf, M., Gerlach, C., Sottriffer, C. A., Heine, A., Klebe, G., 2006. Expect the unexpected or caveat for drug designers: multiple structure determinations using aldose reductase crystals treated under varying soaking and co-crystallisation conditions. *J Mol Biol*. 363, 174-87.
- Straus, D. S., Glass, C. K., 2001. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev*. 21, 185-210.
- Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G., Glass, C. K., 2000. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 4844-9.
- Suzuki, K., Shono, F., Uyeda, M., 1998a. Inhibition of topoisomerases by antitumor prostaglandins. *Biosci Biotechnol Biochem*. 62, 2073-5.
- Suzuki, M., Kiho, T., Tomokiyo, K., Furuta, K., Fukushima, S., Takeuchi, Y., Nakanishi, M., Noyori, R., 1998b. Rational design of antitumor prostaglandins with high biological stability. *J Med Chem*. 41, 3084-90.
- Suzuki, M., Mori, M., Niwa, T., Hirata, R., Furuta, K., Ishikawa, T., Noyori, R., 1997. Chemical Implications for Antitumor and Antiviral Prostaglandins: Reaction of D7-Prostaglandin A1 and Prostaglandin A1 Methyl Esters with Thiols. *J Am Chem. Soc.* 119, 2376-2385.
- Szakacs, G., Jakab, K., Antal, F., Sarkadi, B., 1998. Diagnostics of multidrug resistance in cancer. *Pathol Oncol Res*. 4, 251-7.
- Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., Mori, Y., 2008. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)*. 2, 287-98.
- Takemura, M., Endo, S., Matsunaga, T., Soda, M., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Tajima, K., Iinuma, M., Hara, A., 2011. Selective inhibition of the tumor marker aldose reductase family member 1B10 by oleanolic acid. *J Nat Prod*. 74, 1201-6.
- Tammali, R., Srivastava, S. K., Ramana, K. V., 2011. Targeting aldose reductase for the treatment of cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 11, 560-71.
- Tang, X. H., Gudas, L. J., 2011. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol*. 6, 345-64.
- Tanikawa, M., Yamada, K., Tominaga, K., Morisaki, H., Kaneko, Y., Ikeda, K., Suzuki, M., Kiho, T., Tomokiyo, K., Furuta, K., Noyori, R., Nakanishi, M., 1998. Potent prostaglandin A1 analogs that suppress tumor cell growth through induction of p21 and reduction of cyclin E. *J Biol Chem*. 273, 18522-7.
- Tarle, I., Borhani, D. W., Wilson, D. K., Quijcho, F. A., Petrash, J. M., 1993. Probing the active site of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Asp-43, Tyr-48, Lys-77, and His-110. *J Biol Chem*. 268, 25687-93.
- Tawada, H., Sugiyama, Y., Ikeda, H., Yamamoto, Y., Meguro, K., 1990. Studies on antidiabetic agents. IX. A new aldose reductase inhibitor, AD-5467, and related 1,4-benzoxazine and 1,4-benzothiazine derivatives: synthesis and biological activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 38, 1238-45.
- Tew, K. D., 1994. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res*. 54, 4313-20.
- Tew, K. D., 2007. Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Biochem Pharmacol*. 73, 1257-69.

- Thomas, S. C., Ryan, M. A., Shanley, T. P., Wong, H. R., 1998. Induction of the stress response with prostaglandin A1 increases I-kappaB $\alpha$  gene expression. *FASEB J.* 12, 1371-8.
- Urzhumtsev, A., Tete-Favier, F., Mitschler, A., Barbanton, J., Barth, P., Urzhumtseva, L., Biellmann, J. F., Podjarny, A., Moras, D., 1997. A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure.* 5, 601-12.
- Van Heyningen, R., 1959. Formation of polyols by the lens of the rat with sugar cataract. *Nature.* 184, 194-196.
- van Iersel, M. L., Cnubben, N. H., Smink, N., Koeman, J. H., van Bladeren, P. J., 1999. Interactions of prostaglandin A2 with the glutathione-mediated biotransformation system. *Biochem Pharmacol.* 57, 1383-90.
- van Westrhenen, R., Aten, J., Abera, M., Dragt, C., Deira, G., Krediet, R., 2005. Effects of inhibition of the polyol pathway during chronic peritoneal exposure to a dialysis solution. *Peritoneal Dialysis International.* 25.
- Vedantham, S., Noh, H., Ananthakrishnan, R., Son, N., Hallam, K., Hu, Y., Yu, S., Shen, X., Rosario, R., Lu, Y., Ravindranath, T., Drosatos, K., Huggins, L. A., Schmidt, A. M., Goldberg, I. J., Ramasamy, R., 2011. Human aldose reductase expression accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 1805-13.
- Verma, M., Martin, H. J., Haq, W., O'Connor, T. R., Maser, E., Balendiran, G. K., 2008. Inhibiting wild-type and C299S mutant AKR1B10; a homologue of aldose reductase upregulated in cancers. *Eur J Pharmacol.* 584, 213-21.
- Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maebara, K., Kamiya, N., Jingami, H., Morikawa, K., 2009. Structural insight into PPAR $\gamma$  activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J Mol Biol.* 385, 188-99.
- Wang, C., Yan, R., Luo, D., Watabe, K., Liao, D. F., Cao, D., 2009. Aldo-keto reductase family 1 member B10 promotes cell survival by regulating lipid synthesis and eliminating carbonyls. *J Biol Chem.* 284, 26742-8.
- Wang, F., Tian, F., Whitman, S. A., Zhang, D. D., Nishinaka, T., Zhang, N., Jiang, T., 2012. Regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1-dependent aldose reductase expression by the Nrf2 signal pathway in human mesangial cells. *Eur J Cell Biol.* 91, 774-81.
- Wang, R., Wang, G., Ricard, M. J., Ferris, B., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Hackett, N. R., Gudas, L. J., Crystal, R. G., 2010. Smoking-induced upregulation of AKR1B10 expression in the airway epithelium of healthy individuals. *Chest.* 138, 1402-10.
- Wetzelberger, K., Baba, S. P., Thirunavukkarasu, M., Ho, Y. S., Maulik, N., Barski, O. A., Conklin, D. J., Bhatnagar, A., 2010. Postischemic deactivation of cardiac aldose reductase: role of glutathione S-transferase P and glutaredoxin in regeneration of reduced thiols from sulfenic acids. *J Biol Chem.* 285, 26135-48.
- Wilson, D. K., Tarle, I., Petrash, J. M., Quijcho, F. A., 1993. Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 9847-51.
- Wright, D. H., Metters, K. M., Abramovitz, M., Ford-Hutchinson, A. W., 1998. Characterization of the recombinant human prostanoid DP receptor and identification of L-644,698, a novel selective DP agonist. *Br J Pharmacol.* 123, 1317-24.
- Yabe-Nishimura, C., Nishinaka, T., Iwata, K., Seo, H. G., 2003. Up-regulation of aldose reductase by the substrate, methylglyoxal. *Chem Biol Interact.* 143-144, 317-23.

- Yamada, Y., 2002. Studies on discovery and synthesis of bioactive marine organic molecules. *Yakugaku Zasshi*. 122, 727-43.
- Yan, R., Zu, X., Ma, J., Liu, Z., Adeyanju, M., Cao, D., 2007. Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention. *Int J Cancer*. 121, 2301-6.
- Yanez-Mo, M., Lara-Pezzi, E., Selgas, R., Ramirez-Huesca, M., Domínguez-Jimenez, C., Jimenez-Heffernan, J. A., Aguilera, A., Sanchez-Tomero, J. A., Bajo, M. A., Álvarez, V., Castro, M. A., del Peso, G., Cirujeda, A., Gamallo, C., Sánchez-Madrid, F., López-Cabrera, M., 2003. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*. 348, 403-13.
- Yoshitake, H., Takahashi, M., Ishikawa, H., Nojima, M., Iwanari, H., Watanabe, A., Aburatani, H., Yoshida, K., Ishi, K., Takamori, K., Ogawa, H., Hamakubo, T., Kodama, T., Araki, Y., 2007. Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 17, 1300-6.
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Harding, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M., Lazar, M. A., 1995. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem*. 270, 23975-83.
- Zablocki, G. J., Ruzyski, P. A., Overturf, M. A., Palla, S., Reddy, G. B., Petrash, J. M., 2011. Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens. *Chem Biol Interact*. 191, 351-6.
- Zhang, H., Forman, H. J., 2012. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 23, 722-8.
- Zhong, L., Liu, Z., Yan, R., Johnson, S., Zhao, Y., Fang, X., Cao, D., 2009. Aldo-keto reductase family 1 B10 protein detoxifies dietary and lipid-derived alpha, beta-unsaturated carbonyls at physiological levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 387, 245-50.
- Zorrilla, S., Garzón, B., Pérez-Sala, D., 2010. Selective binding of the fluorescent dye 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid to peroxisome proliferator-activated receptor gamma allows ligand identification and characterization. *Anal Biochem*. 399, 84-92.
- Zu, X., Yan, R., Robbins, S., Krishack, P. A., Liao, D. F., Cao, D., 2007. Reduced 293T cell susceptibility to acrolein due to aldose reductase-like-1 protein expression. *Toxicol Sci*. 97, 562-8.
- Zusman, R. M., Snider, J. J., Cline, A., Caldwell, B. V., Speroff, L., 1974. Antihypertensive function of renal-cell carcinoma. Evidence for a prostaglandin-A-secreting tumor. *N Engl J Med*. 290, 843-5.